

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**



## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

#### **CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

#### **“OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA”**

#### **TESIS DE GRADO**

#### **PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

#### **PRESENTADO POR**

**EVELYN MISHEL CAZORLA MARTÍNEZ**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2014**

## **AGRADECIMIENTO**

*En primer lugar agradezco a Dios por darme la fortaleza y sabiduría necesarias para llegar donde estoy.*

*De forma especial a la Dra. Nancy Veloz, Directora de Tesis, por haber confiado en mí para desarrollar esta investigación, al Dr. Roberto Erazo, Ing. Verónica Bravo, Ing. Cristian Chuquín y personal del LABCESTTA.*

*A la Dra. Fabiola Villa, miembro de tribunal, quien me ha sabido guiar con su conocimiento.*

**Evelyn C.**

## DEDICATORIA

*A mi papá Alfonso Cazorla, que ha sabido guiarme y apoyarme en todo momento, a mi mamá Patricia Martínez quien ha sido el pilar fundamental en mi vida para lograr los objetivos que me he planteado.*

*A mis hermanos Roberto, Alfonso, Cristian y Marlon quienes jamás han dejado de creer en mí, apoyándome siempre he incansablemente.*

*A mis sobrinos, Kátheryn, Romyna, Marlito y Emilye que con sus ocurrencias jamás pasan desapercibidos en mí día a día.*

*A todos mis tíos, primos y mi abuelita Celinda que de una u otra forma me han brindado su apoyo y han sabido guiarme con sus consejos y sabiduría.*

*Y finalmente a todos mis amigos que siempre estuvieron ahí en más de una ocasión, siendo complemento fundamental en mi vida.*

**Evelyn C.**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de Tesis certifica que El trabajo de investigación “**OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA**”, de responsabilidad de las Señorita Egresada Evelyn Mishel Cazorla Martínez ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Dr. Silvio Álvarez <b>DECANO FAC. CIENCIAS</b>	.....	.....
Dra. Nancy Veloz <b>DIRECTORA ESC. CC. QQ.</b>	.....	.....
Dra. Nancy Veloz <b>TUTORA DE TESIS</b>	.....	.....
Dra. Fabiola Villa <b>ASESORA DE TESIS</b>	.....	.....
Ing. Eduardo Tenelanda <b>DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	.....	.....

“Yo Evelyn Mishel Cazorla Martínez soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”.

---

Evelyn Cazorla

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>As</b>	Arsenio
<b>Atm</b>	Atmósferas de presión
<b>B</b>	Boro
<b>Ba</b>	Bario
<b>BSR</b>	Bacterias heterótrofas anaerobias
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>CESTTA</b>	Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>Cu</b>	Cobre
<b>Fe<sup>+3</sup></b>	Hierro con estado de oxidación +3
<b>g</b>	Gramos
<b>GPS</b>	Sistema de posicionamiento global
<b>h</b>	Horas
<b>HAP's</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>Hg</b>	Mercurio

<b>H<sub>2</sub>S</b>	Ácido sulfhídrico
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm Hg</b>	Milímetros de mercurio
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>N°</b>	Número
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>Pb</b>	Plomo
<b>PCB's</b>	Bifenilos policlorados
<b>PEA</b>	Población económicamente activa
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>%</b>	Porcentaje
<b>S</b>	Azufre
<b>SAR</b>	Adsorción de Sodio
<b>Se</b>	Selenio
<b>TULAS</b>	Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria

**U<sup>+</sup>6**            Uranio con estado de oxidación +6

**V**                Vanadio

**µm**             Micrómetros

**Zn**              Zinc



## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO

DEDICATORIA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

### Contenido

Resumen.....	18
Summary.....	19
Introducción.....	20
Justificación.....	22
Objetivo general: .....	23
Objetivos específicos: .....	23
CAPÍTULO I .....	24
1. MARCO TEÓRICO .....	24
1.1. Riobamba .....	24
1.2. Laguna San Antonio .....	24
1.3. Sedimentos.....	25
1.3.1. Tipos de sedimentos lacustres.....	25
1.3.1.1. Modelo de facies: .....	26
1.3.2. Contaminación por sedimentos:.....	27
1.3.3. Uso del sedimento estabilizado.....	28
1.4. Biotecnología .....	28
1.4.1. Biotecnología Ambiental .....	29
1.4.2. Biorremediación .....	29

1.4.2.1. Tipos de biorremediación:.....	30
1.4.2.2. Ventajas y desventajas de la biorremediación .....	31
1.5. Bacterias.....	32
1.5.1. Estructura física y química de las bacterias .....	32
1.5.1.1. Protoplastos bacterianos: .....	32
1.5.1.2. Estructuras internas:.....	33
a. La espora bacteriana: .....	33
b. Núcleo bacteriano: .....	34
c. Citoplasma:.....	35
1.5.2. Crecimiento bacteriano .....	36
1.5.2.1. Curva de crecimiento.....	36
a. Fase de latencia .....	36
b. Fase exponencial.....	37
c. Fase estacionaria.....	37
d. Fase de muerte.....	38
1.5.3. Clasificación de las bacterias .....	38
1.5.4. Identificación de bacterias por composición de la pared celular que reacciona a la tinción de Gram .....	41
1.5.4.1. Diferencias entre gram positivas y gram negativas .....	41
1.6. Medios de cultivo .....	47
1.6.1. Medios sintéticos o definidos .....	48
1.6.2. Medios complejos .....	48
1.6.3. Tipos de medios .....	49
1.7. Metales pesados.....	50
1.8. Bacterias de las aguas.....	51
1.9. Biosorción (inmovilización microbiana de metales) .....	52
1.9.1. Aplicaciones y estado de desarrollo .....	53
1.9.2. Precipitación de metales (inmovilización microbiana) .....	54
1.9.2.1. Precipitación reductora .....	54
1.9.2.2. Biomineralización .....	55
1.9.3. Aplicaciones prácticas .....	56
1.9.4. Biolixiviación (movilización microbiana de metales) .....	56
1.9.5. Respuesta de las bacterias a los metales .....	57
1.10. Legislación ambiental relevante .....	59
CAPÍTULO II .....	63
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	63

2.1.	Lugar de la investigación .....	63
2.1.1.	Información general de la provincia de Chimborazo.....	63
a.	Extensión territorial .....	63
b.	Altitud.....	63
c.	Límites .....	64
d.	Clima .....	64
e.	División política .....	64
f.	Caracterización de la zona.....	65
2.1.2.	Trabajo de laboratorio .....	65
2.1.3.	Sedimento contaminado .....	66
2.1.4.	Materiales y reactivos utilizados.....	66
2.2.	Diseño experimental .....	66
2.2.1.	Variables de control .....	66
2.2.2.	Respuestas experimentales.....	67
2.2.3.	Análisis de datos.....	67
2.2.3.1.	Esquema de la distribución de la investigación en el laboratorio .....	67
2.3.	Métodos .....	68
2.3.1.	Muestreo.....	68
2.3.1.1.	Recolección del material base .....	68
2.3.2.	Métodos analíticos .....	69
2.3.2.1.	Determinación analítica de metales pesados: cobre .....	69
2.3.2.2.	Determinación analítica de metales pesados: vanadio .....	69
2.3.2.3.	Determinación analítica de metales pesados: boro.....	69
2.3.2.4.	Determinación analítica de metales pesados: bario .....	70
2.4.	Levantamiento de la línea base .....	71
	CAPÍTULO III .....	73
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	73
3.1.	Siembra .....	73
3.2.	Aislamiento .....	75
3.3.	Identificación.....	77
3.4.	Elaboración de bancos bacterianos .....	80
3.5.	Pruebas de selección.....	82
3.5.1.	Objetivo .....	82
3.5.2.	Prueba de reducción de contaminantes .....	82
3.5.3.	Prueba de antagonismo.....	87
3.6.	Prueba de identificación.....	89

3.7. Masificación .....	92
CAPÍTULO IV .....	95
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
4.1. Línea Base.....	95
4.1.1. Caracterización del componente ambiental físico (abiótico) .....	95
4.1.1.1. Características de los cantones que conforman la laguna de San Antonio .....	95
4.1.1.2. Ubicación geográfica .....	97
4.1.1.3. Hidrografía.....	97
4.1.1.4. Clima .....	98
4.1.1.5. Hidrología .....	99
4.1.1.6. Nivel freático.....	100
4.1.1.7. Geología.....	100
4.1.1.8. Geomorfología.....	100
4.1.1.9. Uso del suelo.....	101
4.1.1.10. Calidad del agua de la laguna San Antonio .....	101
4.1.2. Caracterización del componente ambiental biológico (biótico) .....	104
4.1.2.1 Flora.....	104
4.1.2.2 Fauna .....	108
4.1.3. Demografía .....	112
4.1.4. Economía .....	113
4.1.5. Interés humano.....	114
4.2. Análisis físico químico del sedimento.....	123
4.3. Obtención de cepas puras .....	125
4.4. Biosorción de metales pesados (Cu, Ba, V y B) .....	127
4.5. Prueba de antagonismo .....	132
4.6. Pruebas de identificación .....	133
4.7. Conteo de aerobios mesófilos.....	134
CAPÍTULO V.....	136
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	136
5.1. Conclusiones .....	136
5.2. Recomendaciones .....	137
BIBLIOGRAFÍA .....	138
ANEXOS.....	142

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.....	67
Tabla N° 2: Criterios de calidad del suelo.....	93
Tabla N° 3: Parámetros climáticos promedio de Riobamba.....	97
Tabla N° 4: Análisis de aguas de la laguna de San Antonio. Código LAB-A2082-13.....	98
Tabla N° 5: Análisis de aguas de la laguna de San Antonio. Código LAB-A2083-13.....	107
Tabla N° 6: Datos demográficos del cantón Riobamba.....	107
Tabla N° 7: Población urbana y rural.....	109
Tabla N° 8: Población económicamente activa.....	108
Tabla N° 9: Indicador de educación por sexo.....	111
Tabla N° 10: Índice de empleo.....	113
Tabla N° 11: Índices de salud.....	118
Tabla N° 12: Resultados del análisis físico-químico del sedimento.....	119

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Variable de control.....	61
Cuadro N° 2: Distribución de las muestras.....	62
Cuadro N° 3: Concentración inicial y final del mix de metales.....	63
Cuadro N° 4: Coordenadas geográficas.....	92
Cuadro N° 5: Lista de taxones de flora de la laguna San Antonio.....	99
Cuadro N° 6: Lista de taxones de avifauna de la laguna San Antonio.....	102
Cuadro N° 7: Lista de taxones de masto fauna de la laguna San Antonio.....	105
Cuadro N° 8: Lista de taxones de herpetofauna la laguna San Antonio.....	106
Cuadro N° 9: Características macroscópicas y microscópicas las cepas puras.....	121
Cuadro N° 10: Concentración de metales.....	122
Cuadro N° 11: Concentración de bario retenida por la biomasa.....	125
Cuadro N° 12: Concentración de cobre retenida por la biomasa.....	125
Cuadro N° 13: Concentración de vanadio retenida por la biomasa.....	126
Cuadro N° 14: Tipos de bacterias.....	128
Cuadro N° 15: Conteo aerobios mesófilos.....	129

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Resultados de concentración inicial y final de cobre.....	122
Gráfico N° 2: Resultados de concentración inicial y final de bario.....	123
Gráfico N° 3: Resultados de concentración inicial y final de vanadio.....	123
Gráfico N° 4: Resultados de concentración inicial y final de boro.....	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Ubicación de la provincia de Chimborazo.....	59
---	----



## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía N° 1: Siembra del inóculo.....	70
Fotografía N° 2: Verificación de cepas puras.....	72
Fotografía N° 3: Tinción Gram.....	74
Fotografía N°4: Elaboración de los bancos bacterianos.....	77
Fotografía N°5: ICP.....	82
Fotografía N° 6: Prueba de Antagonismo cepa L5.....	84
Fotografía N°7: Adición de reactivos en la pruebas de identificación.....	86
Fotografía N° 8: Comparación de colores con las pruebas de identificación...	87
Fotografía N° 9: Masificación.....	89
Fotografía N° 10: Prueba de antagonismo cepa L10.....	127
Fotografía N° 11: Conteo de aerobios mesófilos.....	129

## RESUMEN

Se realizó la obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio, ciudad Riobamba, provincia Chimborazo, para posteriormente hacer posible la biorremediación en sedimentos contaminados.

Se inocularon las muestras del sedimento, consecutivamente estas se aislaron hasta obtener cepas puras, se realizó la caracterización macroscópica y microscópica, seguidamente se elaboraron bancos bacterianos, con la ayuda de equipos como autoclave, cámara de flujo horizontal e incubadora. Además se realizaron pruebas de degradación de contaminantes, pruebas de antagonismo y finalmente se llevó a cabo la masificación del consorcio bacteriano.

Resultando un total de 7 cepas, las que después de haber sido sometidas a un mix de metales, redujeron la concentración de 40ppm de Bario a 27,58ppm, en el caso del Cobre de 5ppm a 0,32ppm y de 6ppm de Vanadio a 0,30ppm siendo estos resultados favorables, seguidamente se realizó la identificación bioquímica de estas cepas dando como resultado que las cepas L3, L4, L5, L7 y L10 son el microorganismo *Xenorhabdus nematophilys* y las cepas L9 y L12 son *E. coli* – *inactiva* y en la masificación el conteo de aerobios fue  $38 \times 10^8$  UFC/mL, siendo una concentración buena.

La aplicación de este consorcio bacteriano, ayudará a minimizar la contaminación por metales pesados como son el Cobre, Boro, Bario y Vanadio.

Se recomienda a la Ilustre Municipalidad de Riobamba llevar a cabo el mantenimiento y limpieza del espejo de agua y sedimento de la laguna San Antonio, mediante el uso y aplicación de consorcios bacterianos nativos, puesto que, se presume la existencia de contaminación por metales pesados en la misma.

## SUMMARY

The native sediment bacterial consortium at San Antonio Lake, Riobamba City, Chimborazo Province, was conducted to further enable bioremediation in contaminated sediments.

Sediment samples were inoculated consecutively these were isolated to obtain pure strains, microscopic and macroscopic characterization was performed, followed by bacterial banks that were developed with help of equipment like autoclave, horizontal flow chamber and incubator. Further evidence of degradation of pollutants, antagonism tests were performed and finally carried out the mass of the bacterial consortium.

Resulting in a total of seven stains, which after have been subjected to a mix of metals, it reduced the concentration from 40ppm with barium, copper in the case from 5ppm to 0.32ppm and vanadium from 6ppm to 0.30ppm, being these favorable results, after that, a biochemical identification was performed resulting that the strains L3, L4, L5, L7 and L10 are *Nematophilys Xenorhabdus* microorganism and L9 and L12 are *E. Coli* – *inactive*, in the massification the aerobic bacteria counting was  $38 \times 10^8$  UCF/mL, which is a good concentration.

The application of this bacterial consortium will help minimize contamination by heavy metals such as copper, boron, barium and vanadium.

It is recommended to the Riobamba's city hall to carry out the maintenance and cleaning of the water surface and sediment of Lake San Antonio, through the use and application of native bacterial consortia since the existence of contamination is presumed for heavy metals in it.

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad la contaminación ha sido un tema muy importante, puesto que es una alteración negativa del estado natural del medio como son el agua, aire y suelo, y que generalmente, es el resultado de la actividad humana considerándose una forma de impacto ambiental, pero es en la época de la revolución industrial donde las personas empiezan a tomar conciencia de lo que esto significa realmente, puesto que las fábricas eliminaban el agua contaminada directamente a ríos y lagunas y de igual manera se contaminaban aire y suelo con las partículas y gases emitidos. (9)

Es por ello que hoy por hoy, se han desarrollado varias formas de mitigar la contaminación, entre las cuales están varias ramas como es el caso de la Biotecnología Ambiental, con el uso y aplicación de microorganismos, los cuales tienen la capacidad de biotransformar cierto tipo de contaminantes como son los metales pesados, estos pueden producir enfermedades en personas, animales y vegetales, por ejemplo el vanadio es un metal que fue utilizado en aleaciones con hierro y acero, este es el causante de la inhibición de ciertas enzimas de animales, dando como resultado varios efectos neurológicos, además puede causar problemas respiratorios, parálisis y efectos negativos en el hígado y riñones. (22)

Las bacterias pueden trabajar de manera sinérgica dando buenos resultados, además es importante reconocer que estas se adaptan a distintos medios, como en el caso de lugares contaminados, desarrollando así distintas capacidades para transformar los contaminantes en sustancias menos dañinas para el ambiente.

Por estas razones el objetivo principal de esta investigación es obtener un consorcio bacteriano proveniente de sedimento lacustre que presumiblemente está contaminado por metales pesados, mediante el uso de técnicas como el aislamiento bacteriano, tinción Gram, pruebas de reducción de contaminantes,

pruebas de antagonismo, identificación bioquímica y finalmente llevar a cabo la bioaumentación del mismo.

## JUSTIFICACIÓN

Los ríos, lagos, lagunas y mares recogen, los desechos producidos por la actividad humana. El ciclo natural del agua tiene gran capacidad de purificación. Pero la misma capacidad de restablecimiento del agua, y su aparente abundancia, da lugar para que sea el vertedero habitual en el cual arrojam los residuos producidos por nuestras actividades cotidianas.

La degradación de las aguas se da desde la antigüedad, pero ha sido básicamente en este siglo cuando se ha incrementado este problema a los ríos y mares de todo el mundo debido a que con la industrialización y el desarrollo económico este problema se ha trasladado a los países en vías de desarrollo, a la vez que en los países desarrollados se producían importantes mejoras.

El presente proyecto tiene una importancia significativa, ya que la descontaminación del agua de las lagunas es trascendental, principalmente debido a que estos contaminantes afectan a la salud humana y a las especies acuáticas que habitan en la misma.

En virtud de las crecientes demandas de reutilización del agua, y de las cada vez más estrictas reglamentaciones ecológicas es necesario disponer de sistemas eficientes de descontaminación del agua y sedimentos como es la biorremediación con bacterias propias de la zona sin afectar al medio.

El presente proyecto ha sido financiado bajo el apoyo del Laboratorio CESTTA siendo el fin principal obtener un consorcio bacteriano nativo que ayude en procesos de biorremediación y de esta forma disminuir los impactos ambientales, por esta razón se encuentra empeñado en desarrollar proyectos que contribuyan a este fin, tal es el caso de la “OBTENCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO DEL SEDIMENTO DE LA LAGUNA SAN ANTONIO DEL CANTÓN RIOBAMBA”.

Cabe recalcar que esta investigación es la partida para dar lugar al proyecto titulado “Identificación, Caracterización y Validación del Consorcio Bacteriano

Nativo y Aplicación en los Sedimentos de la Laguna San Antonio, Riobamba Ecuador”. A su vez es importante indicar que las acciones relacionadas con la preservación del ambiente no son un gasto, sino más bien una inversión para alcanzar un ambiente saludable que ayude en el desarrollo sostenible y sustentable logrando así el equilibrio deseado entre el hombre y la naturaleza.

Para el desarrollo de la presente investigación se desarrollaron los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

- Obtener el consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio del cantón Riobamba.

**Objetivos específicos:**

- Realizar el levantamiento de la Línea Base de la Laguna San Antonio del Cantón Riobamba.
- Efectuar la caracterización físico-química y microbiológica del sedimento de la Laguna San Antonio.
- Determinar las cepas que formarán el consorcio bacteriano del sedimento.
- Identificar las diferentes bacterias nativas que se encuentran en el sedimento mediante el uso de pruebas GNA y GNB.
- Llevar a cabo el escalamiento mediante pruebas de masificación del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna San Antonio.

## **CAPÍTULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO**

#### **1.1. Riobamba**

La ciudad de Riobamba se encuentra ubicada en la Sierra Ecuatoriana, esta fue fundada el 15 de agosto de 1534 cerca de la laguna de Colta, siendo así la primera fundación española en el territorio ecuatoriano. Esta fue destruida totalmente al ocurrir un devastador terremoto en el año de 1797 y seguidamente se trasladó hasta el lugar que ocupa actualmente, convirtiéndose de esta manera en la primera y única ciudad planificada del Ecuador. Durante una corta etapa, tras la fundación de la República del Ecuador, Riobamba fue la capital del país. (18)

De acuerdo con datos oficiales, esta ciudad entendida como área urbana posee aproximadamente 223.586 habitantes, mientras que todo el cantón tiene una población de 263.412 habitantes. Siendo la superficie delimitada por el perímetro urbano de la ciudad aproximadamente 40 km<sup>2</sup>. (18)

#### **1.2. Laguna San Antonio**

La Laguna San Antonio de Padua se encuentra en la vía a Guano tras las instalaciones de la Universidad Nacional de Chimborazo, en esta podemos encontrar diversos pajaritos de pecho rojo y plumas grises, especies como la garza blanca, patos de plumas negras, además de anfibios como ranas y sapos.



Alrededor de la misma es notoria la invasión y construcción de viviendas sin los permisos correspondientes, a esto se suman otros factores como la contaminación y proliferación de totora, siendo esta crítica, influyendo directamente en la eutrofización, modificación de los niveles de agua y sedimentación, dando como resultado un deterioro del hábitat. Además es visible la presencia de basura, material de construcción, animales muertos, pastoreo de animales, dando lugar a que todos estos factores representen una amenaza crítica en la conservación de este recurso.

### **1.3. Sedimentos**

El sedimento es la materia que se encuentra previamente en suspensión en un líquido que precipita por su gravedad hacia el fondo. A esto se le conoce con el nombre de sedimentación. La sedimentación ocurre cuando un material sólido es transportado por una corriente de agua y se posa en el fondo del río, embalse, etc. Además las corrientes de agua pueden transportar varios materiales sólidos en suspensión y también generar sedimentos por sus propias características o a través de la erosión de los cauces. (19)

#### **1.3.1. Tipos de sedimentos lacustres**

Los procesos sedimentarios están estrechamente ligados a los físicos, químicos y biológicos. Pueden ser muy diversos y su importancia relativa depende del tipo de lago. En general, la sedimentación en los lagos está controlada principalmente por el aporte de materiales clásicos, la química de sus aguas y el rango de fluctuaciones de la línea de costa. (16)

Los sedimentos lacustres muestran una gran variedad, y su génesis y composición dependen de las condiciones expresadas anteriormente. En

cuanto a tipos de sedimentos que se desarrollan en lagos, se pueden dividir en cuatro grupos principales (Kukal, 1971):

- Sedimentos mecánicos o clásicos.
- Sedimentos de origen químico (carbonatos, sales).
- Sedimentos bioquímicos que comprenden los depósitos formados por la actividad fisiológica de los organismos.
- Sedimentos orgánicos, incluyendo los sedimentos formados por partes minerales de organismos y los constituidos por partes inestables de organismos (materia orgánica). (16)

Desde un punto de vista mineralógico, Jones y Bowser (1978) diferencian, según su procedencia, una fracción alógena (procedente de áreas externas al lago), una fracción endógena (originada mediante procesos que tienen lugar en la columna de agua) y una fracción autógena (resultante de reacciones en el sedimento después de la deposición). Mientras las fracciones alógenas de los sedimentos lacustres reflejan en principio los factores físicos del sistema lacustre, las fracciones endógenas y autógenas son reflejos, principalmente, de los factores químicos y biológicos. (16)

#### **1.3.1.1. *Modelo de Facies:***

Los sedimentos lacustres poseen probablemente la composición más variada de todos los depósitos de un tipo de ambiente (detritico, carbonatos, evaporíticos, entre otros) no obstante, en un lago determinado generalmente no se encuentran todos presentes. Por ello, es difícil establecer modelos generales de facies lacustres. En un primer paso, la clasificación más lógica de los medios lacustres, en función de los depósitos, es la diferenciación entre lagos desprovistos de estos materiales. (16)

En un segundo paso, estos últimos pueden subdividirse en lagos con depósitos predominantemente carbonatados, evaporíticos, orgánicos, complejos, entre

otros.; existiendo, evidentemente, todos los casos intermedios entre estos tipos extremos. Así Kukal (1971) distingue cuatro tipos fundamentales:

- Lagos en que los sedimentos de grano grueso de zonas someras pasan a cierta profundidad a depósitos arcillosos y ocasionalmente carbonatados.
- Lagos con sedimentos predominantemente carbonatados, con una franja costera estrecha de depósitos detríticos.
- Lagos con sedimentos carbonatados que en la zona profunda pasan a orgánicos.
- Lagos con lodos orgánicos y sapropapel en las zonas centrales. (16)

### **1.3.2. Contaminación por sedimentos:**

Muchos contaminantes químicos, incluyendo los agrotóxicos, contaminantes radiactivos e insumos agrícolas como nitrógeno y fosfatos están asociados a los sedimentos. La erosión y el transporte de sedimentos en el paisaje y en los ríos son las principales formas de transporte de contaminantes en el ambiente. Los contaminantes absorbidos son transportados especialmente en las partículas finas, estableciendo una asociación de problemas causados directamente por los sedimentos, como por ejemplo el aumento de turbidez con problemas de contaminantes (agro tóxicos, nitritos, entre otros) absorbidos (Foster et al, 1985). Como el proceso erosivo es selectivo para partículas menores la deposición incrementa esta fracción. Aproximadamente un 96% de los sedimentos erosionados en el paisaje se depositan en algún lugar entre el origen de los sedimentos y las márgenes de los ríos (Wade et al, 1978) quedando la mayor parte cerca del lugar erosionado (ASCE, 1975). (1)

Las partículas componentes del suelo, arena, limo y arcilla, a través de su propia actividad química asociada a agentes cementantes, se organizan formando agregados (Young, 1980). En el proceso de erosión de suelos, los agregados se destruyen y los sedimentos transportados están compuestos por

una mezcla de estas partículas, y también por pequeños agregados, que posteriormente serán depositados. El transporte y la sedimentación están influenciados principalmente por el tamaño y densidad de las partículas, siendo que las partículas mayores y más pesadas, sedimentan más rápidamente y por lo tanto más próximas de su origen (ASCE, 1975). (1)

### **1.3.3. *Uso del sedimento estabilizado***

Una solución propuesta al problema de la colmatación es el dragado de los sedimentos acumulados en el fondo de las lagunas. Aparte de los problemas técnicos y el coste que conlleva el dragado, esto da lugar a una gran cantidad de material que debe ser gestionado adecuadamente. Mediante un estudio multidisciplinario entre la Universidad Politécnica de Valencia y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias se propusieron e investigaron alternativas de uso de los sedimentos. (8)

El uso agrícola es probablemente una de las alternativas más prometedoras. Sin contar los posibles beneficios agronómicos debido a su contenido en materiales finos, nutrientes y materia orgánica, la aplicación de los sedimentos al suelo presenta la ventaja medioambiental de poder deshacerse de un material residual devolviéndolo al medio de donde inicialmente partió. (8)

## **1.4. Biotecnología**

El término Biotecnología se define como la utilización de organismos para la obtención de bienes y servicios. Aunque el ser humano ha usado procesos biotecnológicos para la fabricación de pan y bebidas, desde varios milenios antes de Cristo y desde mucho antes se ha seleccionado las razas silvestres de plantas y animales para obtener variedades mejoradas con fines

agropecuarios, la revolución biotecnológica se caracteriza por una manipulación genética de organismos usando técnicas microbiológicas, bioquímicas y del ADN recombinado, por consiguiente, deriva de la explosión de los conocimientos biológicos adquiridos en el siglo XX. La Biotecnología repercute en todos los campos de la Tierra: producción de energía, alimentación, farmacia, medicina, química industrial, minería, urbanismo, gestión ambiental y bio-conservación. (6)

#### **1.4.1. *Biotecnología Ambiental***

La Biotecnología Ambiental es la aplicación de la Biotecnología a la resolución, o remedio, de los problemas ambientales naturales, agrícolas y antrópicos y a la conservación de la calidad ambiental. De los cuatro tipos de perturbaciones que el ser humano realiza en los ecosistemas, a saber, destrucción de los hábitats, sobreexplotación, introducción de especies y contaminación. (6)

La Biotecnología Ambiental cobra especial relevancia en los procesos de producción y en el tratamiento de la contaminación derivada de una gestión deficiente en el manejo de productos peligrosos o de las acciones intencionadas o fortuitas relacionadas con los mismos. Desde los años 60 ha habido unos ocho mil vertidos de crudo y derivados, causados por accidentes de extracción, transporte o acciones de guerra. (6)

#### **1.4.2. *Biorremediación***

La biorremediación es el empleo de organismos vivos, generalmente procariotas, hongos o plantas para desintoxicar sistemas contaminados. Por ejemplo, algunas plantas adaptadas a suelos que contienen metales pesados

son capaces de acumular concentraciones elevadas de metales potencialmente tóxicos como cinc, níquel, plomo, y cadmio. (6)

La biorremediación presenta ventajas sobre otras técnicas alternativas para eliminar compuestos contaminantes como son los tratamientos físico-químicos, ya que es un proceso natural para destruir contaminantes orgánicos, los productos formados son generalmente inocuos, a reacción coste/efectividad es menor comparada con otras tecnologías y puede ser ejecutada in situ. (6)

#### **1.4.2.1. Tipos de Biorremediación:**

**a. Biorremediación in situ:** Se refiere al tratamiento de compuestos tóxicos en el lugar donde se ha producido la contaminación. A su vez hay dos tipos de técnicas de biorremediación in situ:

- Bioaumento o biomagnificación: Adición de microorganismos naturales o manipulados genéticamente al medio. (6)
- Bioestimulación: Modificación del medio para reforzar el crecimiento de los microorganismos. Normalmente se adicionan nutrientes, oxígeno, entre otros. (6)

**b. Biorremediación ex situ:** El tratamiento de residuos tóxicos se realiza en biorreactores. Los biorreactores vía suspensión se utilizan para la biorrecuperación de terrenos contaminados. El terreno a descontaminar se introduce en un recipiente de contención con suficiente agua para permitir mezcla continua. Normalmente se optimiza la biorrecuperación añadiendo nutrientes, controlando el pH y la temperatura. (6)

#### **1.4.2.2. Ventajas y desventajas de la Biorremediación**

##### **a. Ventajas**

La biorremediación tiene varios beneficios sobre otros métodos como son las técnicas físico químicas que tienen costos más altos y en ocasiones se necesita de equipos con tecnología de punta. Cuando la contaminación se encuentre en lugares inaccesibles se puede llevar a cabo sin necesidad de cavar. Como por ejemplo en el caso de los derrames de petróleo, debido a la permeabilidad del suelo estos pueden traspasar y a su vez contaminar la capa de agua. Esto resulta mucho más económico que el proceso de excavación e incineración que sería la otra alternativa. (23)

En los tratamientos físicos y en la mayoría de los químicos se basan en transferir la contaminación entre los medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere una baja concentración de la contaminación de un medio a otro. Además esta es una técnica poco invasiva y que habitualmente no necesita el uso de componentes estructurales o mecánicos que representen una amenaza para el medio. Comparativamente, es económicamente viable y como se trata de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de las personas. (23)

##### **b. Desventajas**

Cuando se da una biodegradación incompleta se pueden crear intermediarios metabólicos inaceptables, que poseen un poder contaminante parecido o inclusive superior al producto de partida y algunos compuestos contaminantes son tan resistentes que hasta pueden inhibir la biorremediación. Además es

difícil predecir el tiempo requerido para un proceso adecuado y el seguimiento y control de la velocidad o extensión del proceso es costoso. (24)

## **1.5. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares cuyo tamaño varía unos pocos micrómetros generalmente está entre 0.5 y 5µm, y distintas formas incluyendo esferas, barras y también hélices. Las bacterias son procariotas y, por lo tanto estas carecen de un núcleo definido y orgánulos membranosos internos. Habitualmente tienen una pared celular que está formada de peptidoglicano. Muchas bacterias poseen flagelos u otros sistemas para de esta manera desplazarse. (2)

Las bacterias son ubicuas, es decir, pueden vivir en tierra, agua, materia orgánica o en plantas y animales y son los seres más abundantes del planeta. Estas poseen gran importancia en la naturaleza, ya que están presentes en los ciclos naturales del carbono, fósforo, entre otros y también son capaces de transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa. (2)

### **1.5.1. Estructura física y química de las bacterias**

#### **1.5.1.1. Protoplastos bacterianos:**

El protoplasto es una estructura frágil por su membrana citoplásmica que tiene poca resistencia mecánica, tiene propiedades de crecimiento y división. Cuando la pared celular se suprime por disolución enzimática en solución salina fisiológica los protoplastos empiezan a desintegrarse muy rápido como



cuando son formados, dejando una membrana vacía llamada fantasma finalmente fragmentándose ésta membrana. (3)

El protoplasto difiere de la célula intacta en que puede formar esporas y sostiene la multiplicación del virus bacteriano, solo después de que estos procesos ya han sido iniciados en la célula intacta. (3)

#### **1.5.1.2. Estructuras internas:**

Los flagelos se encuentran unidos a los protoplastos ya que los corpúsculos basales donde se originan a nivel de la superficie interna de la pared celular o cerca de la misma, en la que no parecen ser parte integral de la pared celular, ya que perduran después de que la pared se ha desintegrado enzimáticamente. (3)

En la estructura interna también se encuentra la espora bacteriana que representa una etapa en la vida de las bacterias.

##### **a. La espora bacteriana:**

La espora es un cuerpo refringente oval que se encuentra formado dentro de la célula observándose intra y extracelular en el frotis común teñido, apareciendo como un cuerpo refringente no teñido dentro de la célula coloreada, en la cual se puede adherir superficialmente una pequeña cantidad de pigmento delineando su periferia. Las esporas se forman con mayor facilidad en condiciones óptimas en el crecimiento celular, comenzando su aparición al final del periodo exponencial de crecimiento o posteriormente después de éste. (3)

En el interior de la célula la espora tiene forma esferoide oblongada con una dimensión mayor paralela al eje mayor del bacilo, el ancho de ésta es casi la misma de la célula bacteriana. (3)

La espora se puede encontrar en el centro de la célula denominándose central, otras se pueden encontrar una parte en el centro y otra parte en el extremo llamándose subterminal, otras se encuentran en el extremo de la célula designándose terminal. (3)

Es rara la formación de esporas en las bacterias, limitándose a los bacilos. Los productores de esporas como los bacilos aerobios son del género *Bacillus*, se encuentran en el suelo, polvo y agua. Los bacilos anaerobios que forman esporas son del género *Clostridium* también éste género incluye formas saprófitas no patógenas. (3)

La espora del protoplasto tiene una membrana limitante, que está rodeada por la corteza, por medio de una capa de peptidoglicano con un espesor variable, ésta corteza se encuentra formada por capas de proteínas complejas, la espora madura se encuentra rodeada por una exospora delgada como bolsa. (3)

#### **b. Núcleo bacteriano:**

Las bacterias contienen tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN). El ADN se encuentra principalmente en masas dentro de la célula, mientras que el ARN se halla en el citoplasma circundante. (3)

La morfología del núcleo bacteriano se ha determinado primordialmente por estudios de recombinación de caracteres hereditarios durante la conjugación bacteriana, el cromosoma es aproximadamente unas mil veces más largo que el núcleo, por lo que se dice que se encuentra doblado para estar dentro del núcleo. (3)

En micrografías electrónicas se observa que en el protoplasto hay contacto directo real con la membrana citoplásmica.

### **c. Citoplasma:**

El citoplasma de células bacterianas parece tener una estructura mucho menos compleja que la de las células eucariotas.

- **Inclusiones citoplásmicas.-** Las bacterias están compuestas por gránulos citoplásmicos compuestos si no es en su totalidad por polifosfatos, a menudo de alto peso molecular, los gránulos esféricos no se encuentran rodeados por membranas y varían su tamaño, dependiendo del organismo que lo contenga. (3)

Los gránulos se presentan en su mayoría en la etapa de desarrollo rápido, pero tienden a disminuir en fases posteriores de crecimiento.

- **Partículas submicroscópicas.-** Son gránulos minúsculos o pequeñas partículas que se pueden separar de los constituyentes solubles de la célula por medio de centrifugación que sólo se pueden observar en micrografías electrónicas. (3)
- **Ribosomas.-** Los ribosomas son las partículas de mayor interés de todas las partículas submicroscópicas, ya que tienen una gran relación con la síntesis de proteínas.

El ARN citoplásmico de las células bacterianas se puede separar según sus funciones en tres:

- a. RNA ribosómico (rRNA)**
- b. RNA de transferencia (tRNA)**
- c. RNA mensajero (mRNA)**

De éstos el (rRNA) constituye aproximadamente el 80 por 100 del RNA celular total y dos tercios de la masa del ribosoma. (3)

En el núcleo también se encuentran varios DNA que son complementarios del orden en que se hallan en los nucleótidos de los tres tipos de RNA, y estos RNA se sintetizan en base a tales plantillas. (3)

### **1.5.2. Crecimiento bacteriano**

Se puede definir como el incremento en los constituyentes celulares, ocasionando un aumento del número de células, en el caso de los microorganismos que se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria. (17)

#### **1.5.2.1. Curva de crecimiento**

El crecimiento de una población microbiana se analiza por medio de la curva de crecimiento, ésta curva tiene cuatro fases diferentes.

##### **a. Fase de latencia**

En la fase de latencia también denominada (lag), la división celular no se produce inmediatamente, por lo cual no hay un incremento neto de masa, siendo un proceso activo, la célula está sintetizando nuevos componentes. (17)

En la fase de latencia las células se equipan nuevamente, replicando su DNA, además empiezan a incrementar su masa y finalmente se dividen, el tiempo que dure esta fase va a variar considerablemente dependiendo del estado de los microorganismos y también de la naturaleza del medio, pudiendo ser muy prolongada cuando el inóculo proviene de un cultivo viejo o de un cultivo refrigerado, también la inoculación de un cultivo en otro químicamente diferente resulta también en una fase de latencia mayor. (17)

#### **b. Fase exponencial**

En la fase exponencial denominada también logarítmica (log), los microorganismos se desarrollan y dividen hasta un nivel máximo posible, dependiendo de si tienen condiciones óptimas, la velocidad de crecimiento es constante, ya que, los microorganismos se duplican en número a intervalos regulares, cada célula se divide diferente que el resto, por esto la curva aumenta suavemente. En esta fase la población es más uniforme. (17)

#### **c. Fase estacionaria**

En esta fase el crecimiento de la población bacteriana cesa y la curva de crecimiento se hace en forma horizontal. Las bacterias llegan a esta fase cuando su concentración es aproximadamente  $10^9$  células por mL, el tamaño final de la población depende de la cual sea la cantidad de nutrientes y otros factores como el tipo de bacteria que sea cultivada, en ésta fase permanecen constantes, ya que puede ser el resultado del equilibrio entre la división y la muerte de las células o sencillamente la población ya no se está dividiendo. (17)

Las bacterias en un cultivo discontinuo pueden entrar en esta fase en respuesta al estrés nutricional, hambre, por niveles bajos de nutrientes, pero para algunas bacterias pueden producir cambios positivos morfológicamente como la formación de endosporas, las bacterias también pueden producir una serie de proteínas del hambre haciéndolas mucho más resistentes. (17)

#### **d. Fase de muerte**

La disminución del número de células vivas es provocada por cambios ambientales nocivos y por acumulación de residuos tóxicos, provocando la fase de muerte. Una cantidad constante de células muere cada hora, éste modelo se mantiene incluso aunque se observe que el número total de células permanece invariable, ya que las células no se lisan inmediatamente después de morir. (17)

La muerte microbiana se define como la pérdida irreversible de la capacidad de multiplicarse, aunque en su mayoría la población microbiana muere de forma logarítmica, la velocidad de mortandad puede disminuir después de reducirse bruscamente la población, por estas razones la fase de muerte puede ser compleja. (17)

#### **1.5.3. Clasificación de las bacterias**

De acuerdo a Richard Gallardo, colaborador de Medicina, las bacterias se pueden clasificar en base a las siguientes características:

### **a) Por su forma y agrupación**

Los modelos de agrupación celular bacteriana son propios de especies definidas y estas son usadas como uno de los criterios para su clasificación. Cuando las células microbianas como en el caso de los cocos se dividen, pueden permanecer unidas unas con otras, dando lugar a la formación de arreglos particulares. (21)

Los bacilos se dividen únicamente en un plano pero en algunos casos las células pueden estar unidas por los extremos o los lados, esto se debe a la etapa del desarrollo en que estén o también a las condiciones del cultivo. (21)

Las bacterias en espiral generalmente no se agrupan, crecen individuales y aisladas.

### **b) Por su requerimiento de oxígeno**

Otro de los aspectos que se deben tener en cuenta en la clasificación de bacterias es la necesidad de oxígeno para vivir. Dependen en gran medida de la disponibilidad de las enzimas eliminadoras de peróxidos y de superóxidos. (21)

- Aerobias estrictas.- Necesitan netamente de  $O_2$  para poder desarrollarse.
- Anaerobias estrictas.- Se desarrollan en ausencia de  $O_2$ , estas usan aceptores finales diferentes del oxígeno como:  $CO_2$ ,  $H_2$  y  $N_2$ , o a su vez poseen un metabolismo estrictamente fermentativo.
- Anaerobias facultativas.- Pueden crecer en presencia o ausencia de  $O_2$ , aunque predominan en medios anaeróbicos.
- Microaerófilas.- Sólo pueden desarrollarse cuando existen bajas tensiones de  $O_2$  y alta presión de  $CO_2$ . (21)

### c) Por su óptimo de temperatura

De acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento las bacterias se clasifican en:

- Termófilas: Crecen entre los 25 y 80°C, su temperatura óptima está entre 50 y 60°C.
- Mesófilas: Crecen entre 10 y 45°C, siendo su temperatura recomendable entre 20 y 40°C.
- Psicrófilas: se desarrollan a temperaturas entre -5 y 30°C, siendo su temperatura óptima 10 y 20°C. (21)

### d) Según el pH en que se desarrollan

Las bacterias se clasifican en:

- Acidófilas: Crecen en un pH entre 1.0 y 5.0.
- Neutrófilas: Suelen desarrollarse en un pH entre 5.5 y 8.5.
- Basófilas: Se desarrollan pH que oscila entre 9.0 y 10.0. (21)

### e) Por su forma de nutrición

Las bacterias presentan requerimientos nutricionales distintos y se clasifican en:

- **Autótrofas quimiosintéticas o fotosintéticas.-** Utilizan la luz solar y también el CO<sub>2</sub> para elaborar su propio alimento. Las autótrofas quimiosintéticas emplean compuestos que son inorgánicos, por ejemplo, el azufre para elaborar su propio alimento y utilizan como fuente de energía el CO<sub>2</sub>. (21)



- **Heterótrofas.-** Estas bacterias pueden utilizar una fuente de carbono orgánico para su alimentación.
- Las bacterias pueden vivir como comensales perturbando a los organismos donde viven, como simbioses formando parte de la flora bacteriana de la piel, cavidades y del tracto digestivo del hombre, animales y saprofitas en su mayoría, los cuales ayudan en la descomposición de la materia orgánica muerta. (21)

#### **1.5.4. *Identificación de Bacterias por su composición de la pared celular que reacciona a la tinción de Gram***

Una forma de caracterizar a las bacterias es mediante tinción Gram, esta consiste en identificar la forma de la célula bacteriana en cocos y en bacilos Gram positivos y Gram negativos dependiendo de la estructura de su pared celular. (3)

Se puede dividir en dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas las cuales se tiñen de color violeta, puesto que retienen el color y Gram negativas las cuales se colorean de un tono rosado como consecuencia de las diferencias en la composición de su pared celular. Existe otro grupo de bacterias denominadas bacilos ácido alcohol resistentes que son diferenciados utilizando la coloración de Ziehl Nielsen, estas bacterias son resistentes a la decoloración ácida permaneciendo teñidos de fucsia. (3)

##### **1.5.4.1. *Diferencias entre Gram positivas y Gram negativas***

Las reacciones de tinción de la célula bacteriana intacta son notablemente uniformes, con dos excepciones importantes: la reacción dependiente de la tinción de Gram y la elevada resistencia a la penetración del colorante y la

decoloración que caracteriza a los denominados bacilos acidorresistentes. La reacción Gram positiva es relativamente rara. Sólo se observa en bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Muy pocas estructuras biológicas son Gram positivas; incluyen cromosomas de algunas especies, mitocondrias, centrosomas y centrómeros. (3)

Se han propuesto muchas teorías para explicar la reacción de la coloración Gram; pueden dividirse en dos categorías principales. Las suposiciones correspondientes al primer grupo asumen un mecanismo químico con un sustrato que se tiñe con el colorante de Gram que es propia de las bacterias Gram positivas. En el segundo grupo, se sugiere que existe una diferencia en la permeabilidad entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. La información predominante actual apoya la segunda de estas categorías y se basa en la estructura y composición de la pared de la célula bacteriana. (3)

Cuando la célula bacteriana se tiñe con un complejo de cristal violeta yodo, este complejo queda atrapado dentro de los organismos Gram positivos y no puede retirarse fácilmente por la acción disolvente debido a la naturaleza del alcohol. Sin embargo, la naturaleza diferente de la pared celular en las bacterias Gram negativas, permite que el complejo de colorante con yodo sea retirado mediante tratamiento con alcohol; esta remoción puede facilitarse a causa del alto contenido de lípidos de las paredes de las células Gram negativas. (3)

#### **a. Envoltura celular: pared celular y membrana citoplasmática**

La aparición de bacterias en formas que no son esféricas demuestra la rigidez de estructura suficiente para resistir las fuerzas de la tensión superficial y de la presión de la turgencia interior de la célula. La pared celular es la estructura principalmente responsable de esta rigidez. En la actualidad es indudable que la estructura exterior, o envoltura, de la célula bacteriana está constituida por la pared celular propiamente dicha y la membrana celular subyacente. La pared

celular no puede apreciarse en los frotis teñidos en forma ordinaria, pero si el citoplasma se retrae de la pared celular al hervir las células en solución alcalina diluida, la pared puede observarse en frotis teñidos con cristal violeta. (3)

#### **b. Estabilidad mecánica**

Debido a sus paredes celulares, en general las bacterias son resistentes a las roturas mecánicas, aunque en forma variable entre sus diversos tipos. Cuando se agitan vigorosamente suspensiones bacterianas mezcladas con esferas diminutas de vidrio en el desintegrador de Mickle, el tiempo necesario para disrupción del 95% o más de células varía entre cinco minutos para bacterias frágiles como el vibrión colérico hasta una hora para el estafilococo. Se obtienen resultados similares sometiendo la suspensión bacteriana a vibración ultrasónica de 20 a 40Kc. Algunas bacterias son muy resistentes a este tratamiento, especialmente los estafilococos y estreptococos; en general, las bacterias Gram positivas son más difíciles de desintegrar por medios mecánicos que las Gram negativas. Esto probablemente es el reflejo de diferencias en la estructura del peptidoglicano de sus paredes celulares. (3)

#### **c. Naturaleza de la envoltura celular**

Entre las bacterias, la naturaleza de la envoltura celular varía considerablemente en su complejidad arquitectónica y grado de diferenciación. Esta membrana, que por lo común tiene aproximadamente 7.5nm de espesor, combina tanto la función de pared celular como de membrana citoplasmática, con la cual tiene semejanza. La estructura de la envoltura de las bacterias Gram negativas es un tanto compleja. Además de la membrana citoplasmática que envuelve al citoplasma, y que aparece como una membrana con aspecto

de rieles en cortes delgados teñidos, la célula está rodeada por una pared celular amorfa. Vista de lado, la pared celular no muestra el aspecto en capas de la membrana citoplasmática y es considerablemente más gruesa, con espesor de 15 a 50nm, aunque se han observado en algunas especies grandes espesores que alcanzan los 80nm. (3)

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas ha sido estudiada en forma amplia y se considera la de mayor complejidad. Típicamente, al observar cortes delgados, se advierte que la envoltura está formada por dos membranas paralelas, constituidas por múltiples capas. La membrana interna, o citoplasmática, es semejante a la que se observa en las células Gram positivas. La pared celular está constituida por una segunda membrana o externa, que a veces tiene un aspecto arrugado. Estrechamente unido a la superficie interna de esta membrana, se encuentra una capa delgada de peptidoglicano, que frecuentemente no se observa como una capa separada. La pared celular Gram negativa tiene de 10 a 15nm de espesor, por lo tanto, es más delgada que la de las bacterias Gram positivas. (3)

#### **d. Mesosomas**

Son orgánulos internos formados por invaginaciones citoplasmáticas, estos pueden tener forma vesicular, laminar o tubular, y puede encontrarse más de un tipo en una célula simple. En su composición química básica, los mesosomas no difieren de la membrana citoplasmática. Predominantemente se encuentran, en su diversa morfología, en las bacterias Gram positivas; en las células Gram negativas son típicamente de tipo laminar. Aunque se ha sugerido muchas funciones relacionadas con los mesosomas, ninguna se ha establecido con firmeza, su importancia en la bioquímica y fisiología de la célula no es muy clara. (3)

#### **e. Capa de peptidoglicano**

La forma y rigidez de las células bacterianas se debe casi por completo a la presencia de una gran estructura polimérica de soporte situada inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática, que ha sido denominada en formas diversas como peptidoglicano, mureína y mucopéptido, el uso actual tiende a favorecer el término peptidoglicano como el más descriptivo. Solo algunas formas bacterianas carecen de esta estructura. (3)

Los peptidoglicanos son susceptibles a las actividades hidrolíticas de diversas enzimas. La mejor conocida de estas es la lisozima. Esta enzima hidroliza los enlaces glucosídicos, como podría esperarse, estas enzimas pueden despolimerizar el peptidoglicano y, en bacterias Gram positivas particularmente, producir la destrucción de la pared celular y la lisis subsecuente de la célula. (3)

#### **f. Pared celular de las bacterias Gram positivas**

Esta pared en las Gram positivas tiene un espesor de 15 a 40nm ordinariamente, y constituye de 20 a 40% del peso seco de la célula. Está formada principalmente por peptidoglicano, y al medir su espesor se advierte una estructura de 15 a 50 capas de peptidoglicano, con espesor de 1nm por capa. (3)

Los ácidos teicoicos que forman parte de la pared celular de las Gram positivas merecen especial atención, ya que estos son un grupo de constituyentes de la pared y membrana celulares con varias semejanzas químicas. Estos ácidos se encuentran asociados a la membrana o a la pared celular. Los ácidos teicoicos asociados a la membrana se consideran en forma covalente al peptidoglicano. (3)

Los ácidos teicoicos no contribuyen a la rigidez de la pared celular y su función es un tanto desconocida. Se piensa que contribuyen a la fijación del magnesio, con lo cual mantienen las condiciones iónicas adecuadas para las enzimas dependiendo de cationes de la envoltura celular. Aunque de ordinario no son inmunogénicos cuando se encuentran aislados, lo son cuando se combinan con otros constituyentes celulares en la célula entera, y por tanto constituyen componentes antigénicos superficiales importantes de las bacterias Gram positivas. (3)

#### **g. Pared celular de las Gram negativas**

Se ha comprobado que las paredes celulares de las Gram negativas son considerablemente más complejas que las de las bacterias Gram positivas, y su estudio ha sido más amplio. La pared celular de las bacterias Gram negativas es un poco más delgada que de las células Gram positivas. La capa de peptidoglicano tiene un espesor de 3 a 8nm, en tanto que el espesor de la membrana exterior por lo general oscila entre 6 y 10nm, y a menudo muestran un aspecto ondulado. También en contraste con las células Gram positivas, la pared de las células Gram negativas constituye sólo alrededor del 20% del peso seco de la célula y contiene cantidades significativas de lípidos, aproximadamente el 20% del peso seco de la célula. (3)

#### **h. Regulación osmótica**

Aunque la pared celular y la membrana citoplasmática son dos estructuras diferentes y separables artificialmente, en la célula bacteriana constituyen una unidad integrada, y su función es en parte la de una barrera osmótica y de mecanismo regulador que separa el plasma celular del medio donde está suspendido, proporcionando a la bacteria el concepto de Claude Bernard del

medio relativamente aislado necesario para los organismos que tienen vida libre. (3)

La contribución de la pared celular a esta función de unión, es principalmente la de una estructura de sostén, pero en bacterias Gram negativas también contribuye a la permeabilidad de la célula intacta en el sentido de actuar como barrera para sustancias del orden de 1000 daltones o más. Aunque esto no es esencial para la economía fisiológica de la célula, proporciona cierta protección contra sustancias de elevado peso molecular, como anticuerpos y enzimas líticas. La membrana citoplasmática funciona como una importante barrera osmótica de la célula y presenta las propiedades acostumbradas de las membranas semipermeables vivas, como la permeabilidad selectiva y el transporte de sustancias a través de la barrera contra gradientes de concentración. (3)

## **1.6. Medios de cultivo**

En su mayoría los estudios en microbiología dependen de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, y esto es posible solo si se dispone de medios de cultivo adecuados. Un medio de cultivo es una preparación líquida sólida utilizada para el crecimiento, transporte, o mantenimiento de microorganismos si se desea utilizar para el crecimiento, deberá contener todos los nutrientes esenciales para ese microorganismo concreto. (17)

Los medios especiales son necesarios para poder aislar y a su vez identificar los distintos tipos de microorganismos, valorar la sensibilidad antibiótica, examinar el agua y los alimentos, en microbiología industrial y en otras actividades. Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y diferentes minerales, la composición precisa de un medio adecuado que dependerá de la especie que se quiere cultivar, porque las necesidades nutricionales varían ampliamente.

El conocimiento del hábitat normal de un microorganismo es útil para elegir un medio de cultivo adecuado porque sus necesidades de nutrientes reflejan su ambiente natural. Un medio se utiliza comúnmente para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para facilitar la identificación de una especie en específico. (17)

#### **1.6.1. Medios sintéticos o definidos**

Algunos microorganismos, especialmente los autótrofos fotolitotróficos, como las cianobacterias y varias algas eucariotas, pueden crecer en medios relativamente sencillos, que contienen CO<sub>2</sub>, como fuente de nitrógeno, sulfato, fosfato, y distintos minerales. Esta clase de medios de la que se conocen todos los componentes se denomina medio definido o medio sintético.

Muchos heterótrofos quimioorganotróficos pueden crecer también en medios definidos con glucosa como fuente de carbono y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. No todos los medios definidos son tan sencillos, sino que pueden elaborarse de docenas de componentes. Los medios definidos se utilizan frecuentemente en investigación, pues a menudo se quiere conocer que está metabolizando el microorganismo experimental. (17)

#### **1.6.2. Medios complejos**

Los medios que contienen algunos ingredientes cuya composición química exacta se desconoce se denominan medios complejos. Estos medios suelen ser muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de distintos microorganismos. Además, estos medios son necesarios porque a menudo se desconocen las necesidades nutricionales de un microorganismo en particular, por lo que no es



posible la elaboración un medio definido. Siendo así el caso de muchas bacterias exigentes, algunas de las cuales pueden incluso requerir un medio que posea sangre o también suero. (17)

Los medios complejos tienen componentes como son las peptonas, extracto de carne y levadura. Las peptonas son proteínas que se obtienen de la digestión proteolítica parcial de carne, caseína, gelatina u otras fuentes proteicas. Sirven como fuente de carbono, energía y de nitrógeno. Los extractos de carne y levadura son medios líquidos de carne de vacuno y de levadura de cerveza, respectivamente. El extracto de carne y el extracto de levadura son una fuente excelente de vitaminas del complejo B, y de otros factores de crecimiento. Existen tres tipos de medios complejos utilizados comúnmente son: 1) caldo nutritivo, 2) caldo de triptona o soja y 3) agar Mac-Conkey. (17)

Si es necesario el uso de un medio sólido para cultivar microorganismos en superficie, se puede solidificar un medio líquido añadiendo agar, entre el 1.0 y 2.0%, el agar es un polímero sulfatado regularmente extraído de las algas rojas, este es un buen agente solidificante porque una vez que se funde en agua hirviendo, puede enfriarse hasta una temperatura hasta de 42°C, sin endurecerse, y no se fundirá nuevamente sino hasta que se alcance una temperatura entre los 80 y 90°C. El agar es además un agente solidificante muy bueno porque la mayoría de los microorganismos no pueden degradarlo. (17)

En ocasiones son utilizados otro tipo de agentes solidificantes. Por ejemplo, el gel de sílice que sirve para cultivar bacterias de tipo autótrofo en medios sólidos y para definir las fuentes de carbono en bacterias heterótrofas, añadiendo a los medios diferentes tipos de compuestos orgánicos. (17)

### **1.6.3. Tipos de medios**

Los medios como el caldo y el agar de triptona y soja son denominados medios para fines generales puesto que mantienen el crecimiento de varios

microorganismos. Para favorecer el crecimiento de microorganismos heterótrofos exigentes se pueden incorporar al medio algunos nutrientes especiales e incluso sangre. Estos medios especiales se denominan medios enriquecidos. (17)

Los medios selectivos en cambio favorecen el crecimiento y desarrollo de microorganismos específicos. Las sales biliares o colorantes como son la fucsina básica y el cristal violeta favorecen el crecimiento de bacterias Gram negativas, inhibiendo el crecimiento de las Gram positivas, sin afectar a las primeras. Los medios “agar endo”, “eosina-azul de metileno” y “MacConkey”, se aprovechan extensamente para detectar *E. coli* y otras bacterias relacionadas en suministros de agua y otros medios de cultivo, estos contienen colorantes que suprimen el crecimiento de las bacterias Gram positivas. (17)

Igualmente se pueden aislar bacterias incubándolas con nutrimentos que puedan ser utilizados de forma concreta. Un medio que contenga celulosa como única fuente de carbono y energía es altamente eficaz para aislar bacterias que digieren celulosa. En definitiva, las posibilidades de diseño de un medio de un medio selectivo son numerosas. (17)

Los medios especiales son medios que diferencian entre grupos distintos de bacterias e inclusive permiten una tipificación tentativa del tipo de microorganismo, de acuerdo a sus características biológicas. El agar-sangre es tanto un medio diferencial como un medio enriquecido. El agar MacConkey es diferencial y selectivo a su vez. Como contiene lactosa y el colorante rojo neutro, las colonias fermentadoras de la lactosa aparecen de color rosa a rojo y son fácilmente diferenciadas de las colonias no fermentadoras. (17)

### **1.7. Metales pesados**

Los metales pesados son los aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua. Estos tienen varias aplicaciones directas en

diferentes procesos de producción de bienes y servicios. Entre los más importantes están: arsénico, cadmio, cobalto, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, estaño y cinc. (15)

En cambio los metales tóxicos son aquellos cuya concentración en el ambiente puede originar perjuicios en la salud de las personas. Los términos metales pesados y metales tóxicos se emplean como sinónimos, pero solamente algunos de ellos pertenecen a ambos grupos. (15)

Algunos metales son necesarios en bajas concentraciones, puesto que forman parte de sistemas enzimáticos, como el caso del cobalto, zinc, molibdeno, o el hierro que forman parte de la hemoglobina. Su ausencia da origen a enfermedades y su exceso intoxicaciones. (15)

Varios factores como son el desarrollo tecnológico, consumo intensivo e indiscriminado y la producción de desechos principalmente urbanos, ha provocado la presencia de muchos metales en cantidades importantes dentro del ambiente, provocando numerosos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas. Con el paso del tiempo estos se van incorporando con los alimentos o incluso como partículas que se respiran y se van acumulando en el organismo, hasta llegar a límites de toxicidad. Si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas, que pueden dañar incluso los tejidos u órganos en los que se han ido acumulando. (15)

### **1.8. Bacterias de las aguas**

La flora bacteriana de cualquier agua la conforman dos grupos típicos: a) bacterias autóctonas, con hábitat en el agua y que solo pueden desarrollarse óptimamente aquí, y b) bacterias procedentes de otros biótupos, especialmente bacterias procedentes de la tierra. Además, sobre las aguas superficiales cae constantemente una lluvia de bacterias procedentes del aire. Todas estas bacterias ocasionales únicamente permanecen vivas en el agua un tiempo

limitado, que si se dilata las convierte en organismos facultativos de las aguas. (14)

El contenido bacteriano es muy variado dependiendo del tipo de agua, concentración de sales inorgánicas y sustancias orgánicas, enturbiamiento, iluminación y temperatura. En este sentido, las bacterias marinas son diferentes de las aguas dulces, y a su vez, las de los ríos suelen ser distintas a las habituales de los medios lacustres. (14)

### **1.9. Biosorción (inmovilización microbiana de metales)**

La biosorción es la separación pasiva de metales y metaloides por interacciones con material biológico vivo o muerto y que, hasta ahora, es el acercamiento más práctico y ampliamente usado para la biorremediación de metales (Barkay y Schaefer 2001). Implica mecanismos físico químicos por los que las especies metálicas son sorbidas y/o acomplexadas en biomasa o productos microbianos (Gadd, 2000). Los procesos de intercambio iónico, en los cuales los iones metálicos son intercambiados hacia componentes de carga opuesta unidos a la biomasa o a una resina. En general, depende del pH del líquido y de las características químicas del metal (Eccles 1999). (24)

Un método alternativo para remover bajas concentraciones de metales es utilizando microorganismos como bacterias, algas y hongos, estos son capaces de fijar y a su vez acumular metales. La remoción de metales puede ser por procedimientos ligados al metabolismo celular o a su vez independientes a dicho metabolismo. En el primer caso los metales son removidos por células vivas, fenómeno que se conoce como bioacumulación. (24)

El segundo procedimiento se conoce como biosorción, en este caso los metales se fijan a la biomasa, que puede estar inactiva o no viable, es decir, que ya no puede ser reducido. La biosorción se lleva a cabo en diferentes partes de la célula, principalmente en la pared celular y puede ser por procesos

tales como intercambio iónico, formación de complejos, quelación, adsorción y micro precipitación inorgánica. El uso de biosorbentes para captar los metales pesados es de gran interés por la variedad y bajo costo de estos materiales. La capacidad de los biosorbentes depende de la naturaleza de estos así como de la forma en que se lleve a cabo la fijación del metal, intercambio iónico quelación, entre otros (Voleskey, 1990). (24)

Un claro ejemplo de biosorción es la remoción de plomo y cadmio a partir de soluciones muy diluidas, con el uso de biomasa seca de algunas tipos de algas cafés como *Ascophyllum* y *Sargassum*, estas con capaces de acumular más de 30% (peso seco) del metal en la biomasa. Además se ha reportado que el micelio de hongos de uso industrial, como *Rhizopus* y *Absidia*, son muy buenos biosorbentes para plomo, cadmio, cobre y zinc y a su vez poseen la capacidad de atrapar otros metales pesados hasta en un 25% del peso seco de la biomasa (Volesky y Holan 1995). (24)

#### **1.9.1. Aplicaciones y estado de desarrollo**

Actualmente esta tecnología ha sido enfocada como un método para así reducir metales de corrientes de residuos y a su vez para el tratamiento de aguas, siendo este un proceso con aplicaciones promisorias para la concentración de metales en suelos. Por ello es importante la estimulación de microorganismos propios de ese medio contaminado los cuales poseen la capacidad de biosorción de metales siendo así una estrategia muy útil para inmovilizar los metales que se encuentran en los suelos y de esta manera impedir la contaminación del agua (Lovley y Coates 1997, Barkay y Schaefer 2001). (24)

Se sabe que ciertas sustancias extracelulares son importantes en la biosoción de metales, pero también se ha demostrado que la capacidad en la sorción de metales depende del organismo, del pH y también del metal, existiendo posibilidades para manipular la biosorción. Por ejemplo en el caso de suelos

arenosos, los metales que están disueltos son absorbidos por la biomasa o a su vez se precipitan, seguidamente se puede separar la biomasa en fase acuosa del suelo por medio de un proceso de floculación. Dando como resultado una considerable reducción en la biodisponibilidad de cadmio, zinc y plomo (Gadd 2000, Beaudette et al. 2002). (24)

### **1.9.2. *Precipitación de metales (inmovilización microbiana)***

En su mayoría las transformaciones que sufren los metales por los microorganismos, incluyendo la oxidación-reducción y alquilación-desalquilación, no poseen funciones biológicas conocidas. Estas suelen darse a través de procesos cuyas funciones primarias no se relacionan con la transformación de metales, pero que alteran su solubilidad, movilidad y toxicidad y, razones por las cuales, pueden ser utilizadas como estrategias de remediación (Lovley y Coates 1997, Barkay y Schaefer 2001). Se pueden distinguir básicamente dos tipos de precipitación de metales: la precipitación reductora y la biomineralización. (24)

#### **1.9.2.1. *Precipitación reductora***

La precipitación reductora es un mecanismo que permite que los microorganismos reduzcan la movilidad y toxicidad de un metal o metaloide, mediante su reducción a un estado redox, más bajo, dando lugar a aplicaciones potenciales para la biorremediación.

Muchos de los organismos que catalizan estas reacciones utilizan los metales o metaloides como aceptores de electrones durante su respiración anaerobia, reduciendo así formas oxidadas muy solubles a formas elementales (reducidas)

insolubles, resultando la detoxificación y/o precipitación del contaminante (Lovley y Coates, 1997, Barkay y Schafer 2001). (24)

Las bacterias sulfo-oxidantes y sulfo-reductoras son de vital importancia para llevar a cabo la precipitación reductora de metales tóxicos como el  $\text{Cr}^{+6}$  y el  $\text{U}^{+6}$ . Además se ha demostrado que la reducción de  $\text{U}^{+6}$  a  $\text{U}^{+4}$  por microorganismos reductores de  $\text{Fe}^{+3}$ , puede remover positivamente uranio de superficies y cuerpos de agua; cuando acoplada con una técnica simple de extracción, la reducción microbiana de  $\text{U}^{+6}$  puede ser utilizada para concentrar uranio de suelos contaminados (Lovley y Coates, 1997, Gadd, 2000). (24)

#### **1.9.2.2. *Biomineralización***

La biomineralización es un proceso mediante el cual se da la generación de precipitados metabólicos. La biomineralización de metales que se presentan como minerales de azufre, hidróxido, fosfato y carbonato, tiene aplicaciones potenciales para la biorremediación (Barkay y Schafer 2001). Una muestra de esta clase de sistemas es el empleo de BSR, bacterias heterótrofas anaerobias, las cuales aprovechan una variedad de sustratos de origen orgánico como por ejemplo el etanol, acetato, celulosa y sulfato, empleados en la recepción de electrones. (24)

El potencial biotecnológico de las BSR reside precisamente en la insolubilidad de los sulfuros de metales tóxicos (Cu, Hg, Cd, As, Se y Pb), formados durante la reducción biológica del sulfato, resultando así su inmovilización y detoxificación (Gadd 2000). Los sulfuros metálicos no son solubles a pH neutro, y algunos de ellos, en condiciones ligeramente ácidas. De esta forma, es posible separar algunos de los metales que poseen elevada toxicidad de los menos tóxicos con base en la química del sulfuro (Eccles 1999). En algunos casos, la inmovilización de sulfuros metálicos puede ser inadecuada; por ejemplo en el caso de la inmovilización del mercurio como  $\text{HgS}$ , que se

considera una práctica ambientalmente poco segura (Barkay y Schaefer 2001). (24)

### **1.9.3. Aplicaciones prácticas**

La inmovilización de metales puede ser aplicada en sitios que se encuentran contaminados por cromato o dicromato ( $\text{Cr}^{+6}$ ), favoreciendo la reducción de  $\text{Cr}^{+6}$  a  $\text{Cr}^{+3}$  por bacterias (Wang y Sheng 1995). Esta reacción es una de las maneras más investigadas de biorremediación de metales. Se conoce una gran variedad de organismos heterótrofos que tienen la capacidad de producir esta reacción, que puede presentarse en presencia o ausencia de oxígeno. Este proceso también puede resultar de mecanismos indirectos de precipitación; por ejemplo, en sistemas con BSR, la reducción de  $\text{Cr}^{+6}$  puede resultar de la reducción indirecta por  $\text{Fe}^{2+}$  y sulfuro producido (Lovley y Coates 1997, Gadd 2000). (24)

### **1.9.4. Biolixiviación (movilización microbiana de metales)**

La biorremediación de suelos que se encuentran contaminados por metales mediante lixiviación microbiana o biolixiviación es una tecnología relativamente nueva, sencilla y segura, utilizada para la extracción de metales a partir de minerales y/o concentrados que los contienen. La recuperación a partir de minerales de azufre o de hierro, se fundamenta en la actividad de bacterias quimiolitotróficas que oxidan hierro y azufre (hierro y sulfo-oxidantes respectivamente), *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, estas son capaces de convertir sulfuros metálicos insolubles a sulfatos solubles y ácido sulfúrico (Bosecker 2001). Esta disolución permite que los metales puedan ser recuperados fácilmente de ambientes infectados y



suelos superficiales, usando estrategias de remediación de bombeo-tratamiento (Lovley y Coates 1997). (24)

Otra opción sumamente factible utilizada para tratar suelos contaminados y recuperar metales a partir de minerales es mediante la biolixiviación heterótrofa, que consiste en la extracción de metales por hongos siendo este un proceso mediado por la producción de compuestos quelantes y acomplejantes y ácidos orgánicos excretados al medio, los cuales proporcionan una fuente de protones y aniones que acomplejan metales. (24)

La biolixiviación heterótrofa es más importante que la biolixiviación autótrofa llevada a cabo por bacterias en los suelos, puesto que la lixiviación heterótrofa puede influir sobre otras tecnologías de tratamientos para suelos que estén contaminados, mediante la translocación fúngica de ciertos metales (Cs, Zn, y Cd), lo que puede dar lugar a su separación y concentración en lugares específicos del micelio y/o cuerpos fructíferos (Gadd 2000, Bosecker 2001). (24)

#### **1.9.5. Respuesta de las bacterias a los metales**

Para llevar a cabo sus funciones metabólicas los microorganismos necesitan de ciertos iones inorgánicos esenciales, como los metales calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso. Sin embargo, son básicamente tóxicos y no tienen actividad biológica (como los denominados metales pesados), o son esenciales pero presentan toxicidad cuando se hallan en concentraciones relativamente altas, como cobre, zinc, cobalto, níquel. Pese a que los mecanismos de toxicidad son varios, los sistemas más frecuentes implican una interferencia con el transporte y la función de los iones fisiológicos fundamentales, o la interacción con las macromoléculas celulares como las enzimas y los ácidos nucleicos. (24)

Los metales tóxicos se encuentran naturalmente en la biósfera en niveles bajos, de forma que no representan un factor de toxicidad para los organismos vivos. Sin embargo, en algunos lugares, como yacimientos minerales o zonas que tienen una alta actividad industrial, los niveles de estos metales pueden llegar a ser muy elevados. De esta forma, los organismos pueden verse afectados, y solamente aquellos que desarrollan mecanismos eficaces de resistencia permanecen en ambientes que han sido alterados por la presencia de los metales nocivos. (24)

Existen varios mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden interactuar con los metales tóxicos:

- a.** Las bacterias son capaces de secretar sustancias las cuales dan lugar a la precipitación extracelular de los iones tóxicos;
- b.** En las cubiertas celulares puede darse la unión de los cationes metálicos, generalmente está basada en las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular;
- c.** También puede darse la acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes del citoplasma;
- d.** Las bacterias pueden dar lugar a transformaciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos dañinas, y,
- e.** Finalmente los sistemas de expulsión de la membrana que reprimen la acumulación de los iones nocivos. (1)

Frecuentemente estos sistemas suelen proporcionar a las bacterias tolerancia a concentraciones altas de los metales tóxicos, aunque se han postulado otras funciones adaptativas para ellos, como su por ejemplo su participación en propiedades de virulencia.

Los genes que son los responsables de los mecanismos de interacción bacterias-metales pueden estar codificados en el cromosoma o en plásmidos. Durante los últimos años, diferentes sistemas bacterianos de expulsión de metales se han descrito a nivel molecular, poniendo en claro algunos pasos de los mecanismos bioquímicos involucrados. (1)

## **1.10. Legislación Ambiental relevante**

### **1.10.1. Constitución de la República del Ecuador**

**Art.3.** Deberes primordiales del Estado, numeral 7.-“Proteger el patrimonio natural y cultural del país”.

**Art.14.** “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak Kawsay*”.

- **Derechos de la naturaleza**

**Art. 71.-** La naturaleza o Pacha Mama, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia y el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos. Toda persona, comunidad, pueblo o nacionalidad podrá exigir a la autoridad pública el cumplimiento de los derechos de la naturaleza. Para aplicar e interpretar estos derechos se observaran los principios establecidos en la Constitución, en lo que proceda. El Estado incentivará a las personas naturales y jurídicas, y a los colectivos, para que protejan la naturaleza, y promoverá el respeto a todos los elementos que forman un ecosistema. (11)

**Art. 73.-** El Estado aplicará medidas de precaución y restricción para las actividades que puedan conducir a la extinción de especies, la destrucción de ecosistemas o la alteración permanente de los ciclos naturales. (11)

Se prohíbe la introducción de organismos y material orgánico e inorgánico que puedan alterar de manera definitiva el patrimonio genético nacional.

**Art. 313.-** El Estado se reserva el derecho de administrar, regular, controlar y gestionar los sectores estratégicos, de conformidad con los principios de sostenibilidad ambiental, precaución, prevención y eficiencia. Los sectores estratégicos, de decisión y control exclusivo del Estado, son aquellos que por su trascendencia y magnitud tienen decisiva influencia económica, social, política o ambiental, y deberán orientarse al pleno desarrollo de los derechos y al interés social. Se consideran sectores estratégicos la energía en todas sus formas, las telecomunicaciones, los recursos naturales no renovables, el transporte y la refinación de hidrocarburos, la biodiversidad y el patrimonio genético, el espectro radioeléctrico, el agua, y los demás que determine la ley. (11)

**Art. 317.-** Los recursos naturales no renovables pertenecen al patrimonio inalienable e imprescriptible del Estado. En su gestión, el estado priorizará la responsabilidad intergeneracional, la conservación de la naturaleza, el cobro de regalías u otras contribuciones no tributarias y de participaciones empresariales; y minimizará los impactos negativos de carácter ambiental, cultural, social y económico. (11)

#### **1.10.2 Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria**

La presente norma técnica ambiental es dictada bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental y se somete a las disposiciones de éstos, es de aplicación obligatoria y rige en todo el territorio nacional. (11)

##### **1.10.2.1. *Criterios generales de descarga de efluentes:***

Normas generales para descarga de efluentes, tanto al sistema de alcantarillado como a los cuerpos de agua.

El regulado deberá mantener un registro de los efluentes generados, indicando el caudal del efluente, frecuencia de descarga, tratamiento aplicado a los efluentes, análisis de laboratorio y la disposición de los mismos, identificando el cuerpo receptor. Es mandatorio que el caudal reportado de los efluentes generados sea respaldado con datos de producción. (11)

Las municipalidades de acuerdo a sus estándares de Calidad Ambiental deberán definir independientemente sus normas, mediante ordenanzas, considerando los criterios de calidad establecidos para el uso o los usos asignados a las aguas. En sujeción a lo establecido en el Reglamento para la Prevención y Control de la Contaminación. (11)

Los laboratorios que realicen los análisis de determinación del grado de contaminación de los efluentes o cuerpos receptores deberán haber implantado buenas prácticas de laboratorio, seguir métodos normalizados de análisis y estar certificados por alguna norma internacional de laboratorios, hasta tanto el organismo de acreditación ecuatoriano establezca el sistema de acreditación nacional que los laboratorios deberán cumplir. (11)

El regulado deberá disponer de sitios adecuados para caracterización y aforo de sus efluentes y proporcionarán todas las facilidades para que el personal técnico encargado del control pueda efectuar su trabajo de la mejor manera posible. (11)

#### **1.10.2.2. Normas de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado público**

Se prohíbe descargar en un sistema público de alcantarillado, cualquier sustancia que pudiera bloquear los colectores o sus accesorios, formar vapores o gases tóxicos, explosivos o de mal olor, o que pudiera deteriorar los materiales de construcción en forma significativa. Esto incluye las siguientes sustancias y materiales, entre otros:

- a. Fragmentos de piedra, cenizas, vidrios, arenas, basuras, fibras, fragmentos de cuero, textiles, etc. (los sólidos no deben ser descargados ni aún después de haber sido triturados).
- b. Resinas sintéticas, plásticos, cemento, hidróxido de calcio.
- c. Residuos de malta, levadura, látex, bitumen, alquitrán y sus emulsiones de aceite, residuos líquidos que tienden a endurecerse.
- d. Gasolina, petróleo, aceites vegetales y animales, hidrocarburos clorados, ácidos, y álcalis. (11)

#### **1.10.2.3. Normas de descarga de efluentes a un cuerpo de agua o receptor**

- **Agua dulce**

Se prohíbe todo tipo de descarga en:

- a. Las cabeceras de las fuentes de agua.
- b. Aguas arriba de la captación para agua potable de empresas o juntas administradoras, en la extensión que determinará el CNRH, Consejo Provincial o Municipio Local y,
- c. Todos aquellos cuerpos de agua que el Municipio Local, Ministerio del Ambiente, CNRH o Consejo Provincial declaren total o parcialmente protegidos. (11)

## **CAPÍTULO II**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Lugar de la investigación**

##### **2.1.1. *Información general de la provincia de Chimborazo***

La provincia de Chimborazo fue fundada políticamente el 25 de junio de 1826, siendo presidente de la Gran Colombia, el libertador Simón Bolívar. En la actualidad esta se divide en 10 cantones y 61 parroquias. (4)

##### **a. Extensión territorial**

La provincia de Chimborazo tiene una área estimada de 648.124 ha repartidas entre diez cantones, siendo los más representativos por su área: Alausí, Guamote, y Riobamba con 165.813, 122.180, y 98.274 has respectivamente. (4)

##### **b. Altitud**

La Provincia de Chimborazo, tiene una diversidad de pisos altitudinales, los mismos que se encuentran emplazados en un rango desde los 132 msnm en el cantón Cumandá hasta los 6.310 msnm en la cima del nevado Chimborazo. (4)

### **c. Límites**

Los límites de la provincia son:

- Al norte: Provincia de Tungurahua.
- Al oeste: Provincia de Bolívar.
- Al sur: Provincias de Cañar y Guayas.
- Al este: Provincia de Morona Santiago.(4)

### **d. Clima**

La Provincia de Chimborazo tiene una gran variedad de climas y microclimas. Estos climas son: el tropical, tropical húmedo, subtropical, templado seco, templado húmedo, frío seco, frío húmedo y glacial en los nevados. (7)

La temperatura ambiente es diferente en toda la provincia. La temperatura promedio se encuentra entre los 25°C en Cumandá y 0° en los nevados; se puede decir que, Chimborazo tiene clima templado. (7)

### **e. División política**

La provincia de Chimborazo está formada por diez cantones: Cumandá, Pallatanga, Guano, Colta, Chambo, Alausí, Chunchi, Guamote, Penipe y Riobamba, además está formada por 61 parroquias. (10)



## f. Caracterización de la zona

Área de estudio:



Figura N° 1: Ubicación de la provincia de Chimborazo

### 2.1.2. Trabajo de laboratorio

La presente investigación se desarrolló en el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), ubicado en la Facultad de Ciencias perteneciente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, situada a 2756 msnm con una temperatura promedio de 13°C a 17°C, humedad relativa del ambiente promedio del 30/40% y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

### **2.1.3. Sedimento contaminado**

- El sedimento contaminado con metales pesados (Cu, V, Ba y B) procedente de la laguna San Antonio presenta una naturaleza manejable y no compacta, siendo esto óptimo para dar paso al procesamiento del mismo y llevar a cabo la obtención del consorcio bacteriano.
- Los análisis físico-químicos del sedimento fueron realizados en el Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (LAB CESTTA).

### **2.1.4. Materiales y reactivos utilizados**

- Los materiales y reactivos utilizados para la presente investigación fueron: frascos estériles, caldo nutritivo, mix de metales y las cepas activadas.

## **2.2. Diseño experimental**

### **2.2.1. Variables de control**

**Cuadro N° 1: Variable de control**

Variable controlada
Temperatura

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

### **2.2.2. Respuestas experimentales**

En el presente proyecto, la respuesta experimental se midió en función de la reducción de la concentración de metales, utilizando todas las cepas que forman parte del consorcio bacteriano.

### **2.2.3. Análisis de datos**

#### **2.2.3.1. Esquema de la distribución de la investigación en el laboratorio**

- Inicialmente se realizó un promedio de la concentración de los metales que se encontraban fuera del límite permisible en el sedimento, para el desarrollo del diseño experimental se sometió al consorcio bacteriano a una concentración superior a esta y una concentración más baja, siendo estas mix1, mix 2 y mix 3.
- Se realizaron tres réplicas de cada uno, los cuales fueron R1, R2 y R3.

**Cuadro N° 2: Distribución de las muestras**

DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS			
C1	R1	R2	R3
C2	R1	R2	R3
C3	R1	R2	R3

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

C1: Mix 1 con tres réplicas (100mL cada una)

C1: Mix 2 con tres réplicas (100mL cada una)

C1: Mix 3 con tres réplicas (100mL cada una)

**Cuadro N ° 3: Concentración inicial y final del mix de metales**

DESCRIPCIÓN	MIX 1	MIX 2	MIX 3
<b>Bario (Ba)</b>			
Concentración inicial (ppm)	40	20	60
<b>Cobre (Cu)</b>			
Concentración inicial (ppm)	5	2	7
<b>Vanadio (V)</b>			
Concentración inicial (ppm)	6	3	9

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

En el cuadro N° 3 podemos observar cuáles fueron las concentraciones a las que se sometió el consorcio bacteriano, siendo estas para el Mix 1 concentraciones promedio de los análisis físico químico realizados, para el Mix 2 una concentración menor en un 50% siendo así la mitad de la concentración que existe en el sedimento y para el Mix 3 una concentración superior en un 50% a la obtenida en los análisis físico químicos realizados.

## **2.3. Métodos**

### **2.3.1. Muestreo**

#### **2.3.1.1. Recolección del material base**

Para llevar a cabo la medición de concentración de los metales se tomaron 20mL de cada replica.

### **2.3.2. Métodos analíticos**

Para el seguimiento de la prueba de reducción de contaminantes se aplicaron los métodos analíticos que se detallan a continuación:

#### **2.3.2.1. Determinación analítica de metales pesados: Cobre**

- **Metodología:** Se realiza una digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
- **Referencia:** Protocolo interno del Laboratorio CESTTA.

#### **2.3.2.2. Determinación analítica de metales pesados: Vanadio**

- **Metodología:** Se realiza una digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
- **Referencia:** Protocolo interno del Laboratorio CESTTA.

#### **2.3.2.3. Determinación analítica de metales pesados: Boro**

- **Metodología:** Se realiza una digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
- **Referencia:** Protocolo interno del Laboratorio CESTTA.

#### 2.3.2.4. *Determinación analítica de metales pesados: Bario*

- **Metodología:** Se realiza una digestión ácida, filtración y determinación por espectroscopia de absorción atómica.
- **Referencia:** Protocolo interno del Laboratorio CESTTA.

#### 2.3.3. *Norma utilizada*

La norma utilizada en este estudio pertenece al Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS) correspondiente a la tabla 2 Criterios de Calidad del Suelo, la cual proporciona los valores de fondo aproximados o límites analíticos de detección para un contaminante en el mismo.

**Tabla N° 1: Criterios de calidad del suelo**

SUSTANCIA	UNIDADES (CONCENTRACIÓN EN PESO SECO)	SUELO
<b>PARÁMETROS GENERALES</b>		
Conductividad	mmhos/cm	2
pH		6 a 8
Relación de adsorción de sodio (índice SAR)		4*
<b>PARÁMETROS INORGÁNICOS</b>		
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	5
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0,5
Cobalto	mg/kg	10
Cobre	mg/kg	30
Cromo total	mg/kg	20
Cromo VI	mg/kg	2,5
Cianuro (libre)	mg/kg	0,25
Estaño	mg/kg	5
Flúor (total)	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0,1
Molibdeno	mg/kg	2
Níquel	mg/kg	20
Plomo	mg/kg	25
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	25
Zinc	mg/kg	60

PARÁMETROS ORGÁNICOS		
Benceno	mg/kg	0,05
Clorobenceno	mg/kg	0,1
Etilbenceno	mg/kg	0,1
Estireno	mg/kg	0,1
Tolueno	mg/kg	0,1
Xileno	mg/kg	0,1
PCB's	mg/kg	0,1
Clorinados alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0,1
Clorobencenos (cada tipo)	mg/kg	0,05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0,1
Hexaclorociclohexano	mg/kg	0,01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0,1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0,05
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) cada tipo	mg/kg	0,2

**FUENTE:** TULAS, TABLA 2

- \* El valor numérico del índice de Adsorción de Sodio (SAR) es la concentración requerida para que un suelo produzca todo tipo de cultivos.

Para los propósitos de esta Norma, los valores de fondo se refieren a los niveles ambientales representativos para un contaminante en el suelo. Los valores pueden reflejar las variaciones geológicas naturales de áreas no desarrolladas o libres de la influencia de actividades industriales o urbanas generalizadas.

#### **2.4. Levantamiento de la Línea Base**

La metodología utilizada para efectuar el levantamiento de la línea base ambiental fueron las siguientes:

- Elaboración de un Formato de Visita, el mismo que sirvió para la recopilación de datos durante la visita a la laguna de San Antonio.
- Visitas de campo in situ en el área de influencia directa e indirecta.

- Lectura de literatura de estudios efectuados en la zona, referente a indicadores económicos y socioeconómicos, indicadores del clima e indicadores ambientales.
- Sistematización de la información recolectada.

Las fuentes de información a la cual se recurrió para efectuar la caracterización de los componentes ambientales, fueron las siguientes:

- Ministerios de Ambiente, Agricultura, Energías no renovables.
- INFOPLAN en su versión actualizada.
- Último Censo Nacional de Población y Vivienda del año 2010.
- Indicadores climatológicos y meteorológicos de INAMHI.
- SIICE en las versiones más actualizadas.



## CAPÍTULO III

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Siembra

##### 3.1.1. *Objetivo*

Establecer el procedimiento para la siembra de microorganismos.

##### 3.1.2. *Materiales*

- Cajas petri plásticas
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Erlenmeyer 1000mL
- Pipeta volumétrica 9mL
- Pera de succión
- Mechero de alcohol
- Guantes de látex
- Fósforos
- Pipeta semiautomática 1mL
- Pipeta semiautomática 0,1mL
- Puntas de 0,1mL
- Puntas de 1mL
- Marcador punta fina

- Frascos estériles
- Espátula
- Cinta indicadora para esterilización
- Asa de vidrio

### **3.1.3. Equipos**

- Balanza digital
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal
- Incubadora (Mettler)
- Shaker
- Cámara digital

### **3.1.4. Sustancias y reactivos**

- Agar nutritivo
- Agua destilada
- Peptona

### **3.1.5. Procedimiento**

- Preparar 1000mL de agar nutritivo.
- Elaborar 500mL de agua peptonada.
- Colocar agua peptonada en los frascos estériles y en los tubos tapa rosca.

- Esterilizar en la autoclave por 20 minutos a 121°C y 1atm de presión.
- Colocar el agar en las cajas petri con condiciones adecuadas de asepsia.
- Sellar las cajas.
- Homogenizar las muestras de sedimento y colocarlo en cada frasco.
- Realizar diluciones hasta la dilución -7.
- Etiquetar las cajas petri.
- Tomar 1mL de cada dilución y sembrar con la ayuda de la pipeta y del asa de vidrio.
- Incubar por 48h a 35.5°C.



**Fotografía N° 1: Siembra del inóculo**

### **3.2. Aislamiento**

#### **3.2.1. *Objetivo***

Establecer el procedimiento para el aislamiento y purificación de las cepas bacterianas.

### **3.2.2. *Materiales***

- Cajas petri plásticas
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Erlenmeyer de 1000mL
- Mechero de alcohol
- Guantes de látex
- Espátula
- Tijera
- Fósforos
- Marcador punta fina
- Asa microbiológica

### **3.2.3. *Equipos***

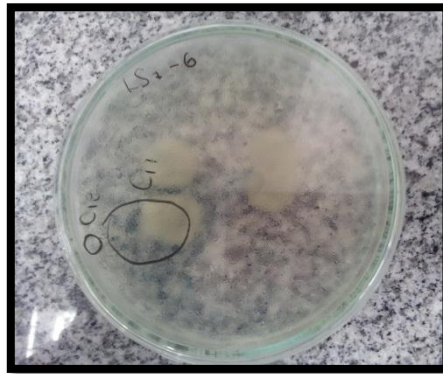
- Balanza digital
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal
- Incubadora (Memmert)

### **3.2.4. *Sustancias y reactivos***

- Agar nutritivo
- Agua destilada

### **3.2.5. Procedimiento**

- Preparar 1000mL de agar nutritivo.
- Esterilizar a 121°C y 1atm de presión durante 20 minutos.
- Colocar en las cajas petri bajo las condiciones de asepsia adecuadas.
- Etiquetar las cajas petri.
- Con la ayuda del asa aislar las cepas que aún están en cultivos mixtos.
- Incubar por 48horas a 35.5°C.



**Fotografía N° 2: Verificación de cepas puras**

### **3.3. Identificación**

#### **3.3.1. Objetivo**

Establecer el procedimiento para la identificación de las cepas bacterianas.

### **3.3.2. *Materiales***

- Porta objetos
- Asa microbiológica
- Mechero de alcohol
- Frascos estériles
- Lápiz
- Papel aluminio
- Cinta parafilm
- Espátula

### **3.3.3. *Equipos***

- Balanza digital
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal
- Microscopio óptico

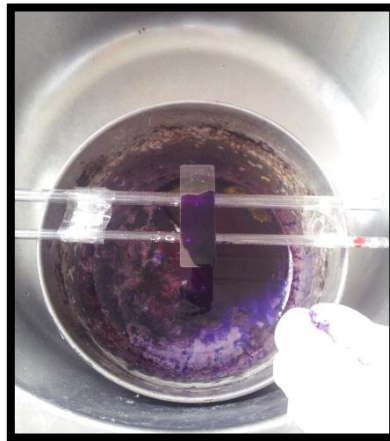
### **3.3.4. *Sustancias y reactivos***

- NaCl
- Agua destilada
- Cristal violeta
- Yodo Gram
- Alcohol cetona
- Safranina

- Aceite de inmersión

### **3.3.5. Procedimiento**

- Preparar 100mL de solución salina.
- Esterilizar a 121°C y 1atm de presión durante 20 minutos.
- Anotar las características macroscópicas de cada cepa.
- Con la ayuda del asa colocar unas gotas de solución salina en el portaobjetos.
- Realizar un frotis de cada cepa en los portaobjetos y dejar secar.
- Realizar la tinción Gram con la ayuda de los reactivos antes mencionados.
- Dejar secar y observar en el microscopio.
- Anotar las características microscópicas.



**Fotografía N° 3: Tinción Gram**

### **3.4. Elaboración de bancos bacterianos**

#### **3.4.1. *Objetivo***

Elaborar el procedimiento para la elaboración de los bancos bacterianos.

#### **3.4.2. *Materiales***

- 2 Erlenmeyer de 1000ml
- Tubos tapa rosca
- Tubos Eppendorf 2,5mL
- Mechero de alcohol
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Pipeta volumétrica 10mL
- Pera de succión
- Asa microbiológica
- Fundas ziploc
- Marcador punta fina
- Pipeta semiautomática
- Puntas de 1mL

#### **3.4.3. *Equipos***

- Autoclave
- Balanza digital



- Cámara de flujo horizontal
- Incubadora Memmert
- Refrigeradora

#### **3.4.4. *Sustancias y reactivos***

- Caldo nutritivo
- Agua destilada
- Glicerol

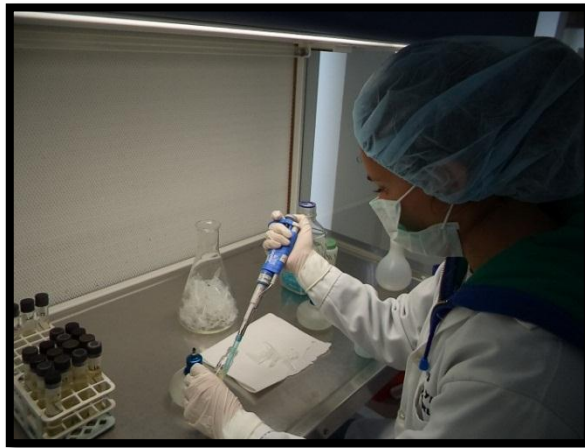
#### **3.4.5. *Procedimiento***

Para la elaboración del banco primario se debe llevar a cabo el siguiente procedimiento:

- Preparar caldo nutritivo
- Preparar caldo nutritivo más glicerol.
- Colocar los tubos Eppendorf en frascos de vidrio.
- Colocar 10mL de las preparaciones en cada tubo y esterilizar.
- Con la ayuda del asa microbiológica y con las condiciones necesarias de asepsia tomar una muestra de cada cepa y la difundirla en el caldo nutritivo.
- Incubar por 24h a 35.5°C.
- Homogenizar las cepas con la mezcla de caldo nutritivo y glicerol.
- Incubar por 24 horas.
- Etiquetar las fundas ziploc.
- De cada tubo colocar 1mL en los tubos Eppendorf con las condiciones de asepsia adecuadas y las guardamos en las fundas ziploc.
- Guardar en la refrigeradora.

La elaboración del banco secundario se realiza de la siguiente forma:

- Tomamos un vial de cada cepa y repetimos el procedimiento llevado a cabo para realizar el banco primario.



**Fotografía N°4: Elaboración de los bancos bacterianos**

### **3.5. Pruebas de selección**

#### **3.5.1. *Objetivo***

Elaborar el procedimiento para encontrar las bacterias más idóneas para la reducción de contaminantes.

#### **3.5.2. *Prueba de reducción de contaminantes***

##### **3.5.2.1. *Materiales***

- Erlenmeyer 1000mL

- Balón de aforo 500mL
- Balanza digital
- Papel aluminio
- Tubos tapa rosca
- Cinta parafilm
- Tijera
- Mechero de alcohol

#### **3.5.2.2. Equipos**

- Agitador
- Reverbero
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal
- ICP
- Digestor
- Equipo de filtrado

#### **3.5.2.3. Sustancias y reactivos**

- Caldo nutritivo
- Estándar de bario
- Estándar de vanadio
- Estándar de boro
- Estándar de cobre
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Fosfato ácido de potasio

- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Nitrato de amonio
- Agua destilada
- Ácido nítrico

#### **3.5.2.4. Cálculos**

Para la determinación de concentración de metales que debe ir en el mix al cual se someterán las bacterias se realizaron los siguientes cálculos:

- **Datos**

Bario

$C_1 \text{ Ba} = ?$

$C_2 \text{ Ba} = 40\text{ppm}$

$V_1 = 14$

$V_2 = 20\text{mL}$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_1 = \frac{C_2 * V_2}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{40 * 20}{14}$$

$$C_1 = 57,14\text{ppm Ba}$$

Boro

C1 Bo = ?

C2 Bo = 2ppm

V1 = 14

V2 = 20mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$C1 = \frac{C2 * V2}{V1}$$

$$C1 = \frac{2 * 20}{14}$$

$$C1 = 2,86ppm B$$

Cobre

C1 Cu = ?

C2 Cu = 5ppm

V1 = 14

V2 = 20mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$C1 = \frac{C2 * V2}{V1}$$

$$C1 = \frac{5 * 20}{14}$$

$$C1 = 7,14ppm Cu$$

Vanadio

$C_1 V = ?$

$C_2 V = 6\text{ppm}$

$V_1 = 14$

$V_2 = 20\text{mL}$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

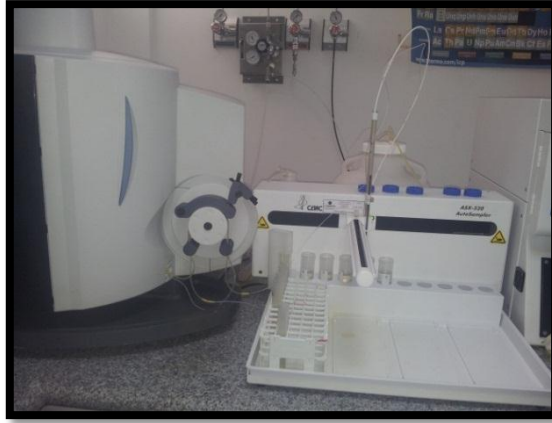
$$C_1 = \frac{C_2 * V_2}{V_1}$$

$$C_1 = \frac{6 * 20}{14}$$

$$C_1 = 8,57\text{ppm V}$$

### **3.5.2.5. Procedimiento**

- Preparar caldo nutritivo y medio mínimo con los reactivos y sustancias necesarias.
- Preparar el mix de metales y aforar a 500mL con el medio mínimo.
- Colocar la mezcla del medio mínimo con el mix de metales en los tubos tapas rosca.
- Esterilizar las soluciones preparadas a 121°C y 1atm de presión por 20 minutos.
- Activar las cepas y dejar incubar por 24h a 35.5°C.
- Colocar las cepas activadas en los tubos con la mezcla y sellar.
- Incubar por 15 días en agitación constante.
- Escoger las cepas que presenten un crecimiento favorable ante los metales pesados.
- Realizar una lectura de las concentraciones de los metales.



**Fotografía N° 5: ICP**

### **3.5.3. Prueba de antagonismo**

#### **3.5.3.1. Objetivo**

Elaborar el procedimiento para llevar a cabo la prueba de antagonismo.

#### **3.5.3.2. Materiales**

- Erlenmeyer 1000mL
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Marcador punta fina
- Guantes de látex
- Cajas petri plásticas
- Sorbetes

- Pipeta automática 0,1mL
- Puntas 0,1mL
- Frascos estériles
- Hisopos
- Pinza
- Mechero de alcohol
- Gradilla

#### **3.5.3.3. Equipos**

- Balanza analítica
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal
- Incubadora Memmer

#### **3.5.3.4. Sustancias y reactivos**

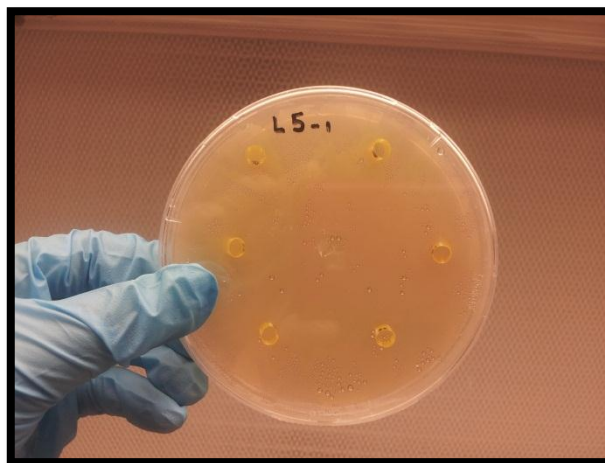
- Caldo nutritivo
- Agar nutritivo
- Agar agar
- Agua destilada
- Alcohol

#### **3.5.3.5. Procedimiento**

- Preparar 1000mL de agar.



- Preparar 500mL de caldo nutritivo.
- Esterilizar a 121°C y 1atm de presión por 20 minutos.
- Colocar el agar en las cajas petri.
- Activar las cepas seleccionadas en la prueba de reducción de contaminantes.
- Etiquetar las cajas y los sorbetes.
- Con la ayuda de un hisopo colocar la cepa que irá de fondo sobre el agar.
- Seguidamente con la ayuda de las pinzas colocar los sorbetes etiquetados en la caja.
- Colocar una gota de cada cepa activada en los sorbetes e incubar por 24h a 35.5°C.
- Observar los resultados.



**Fotografía N° 6: Prueba de antagonismo cepa L5**

### **3.6. Prueba de identificación**

#### **3.6.1. Objetivo**

Elaborar el procedimiento para la identificación de las cepas bacterianas.

### **3.6.2. *Materiales***

- Cinta parafilm
- Mechero de alcohol
- Guantes de látex
- Espátula
- Tubos tapa rosca
- Asa microbiológica
- Pipeta automática 0,1mL
- Puntas 0,1mL
- Pruebas de identificación

### **3.6.3. *Equipos***

- Autoclave
- Incubadora
- Balanza digital
- Cámara de flujo horizontal

### **3.6.4. *Sustancias y reactivos***

- Agua destilada
- NaCl
- Lisina
- Ortinina
- H<sub>2</sub>S

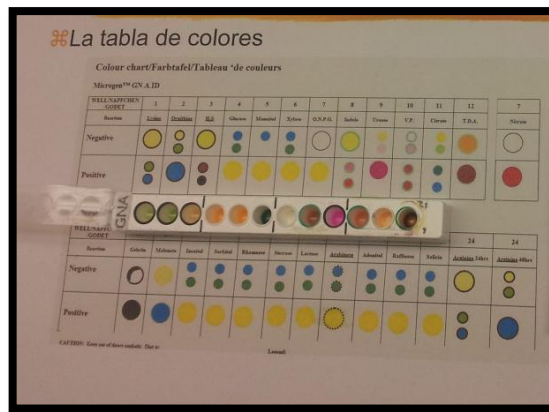
- Indol
- Reactivo Kovac's
- Reactivo VPI
- Reactivo VPII
- TDA

### **3.6.5. Procedimiento**

- Preparar 100mL de solución salina.
- Esterilizar a 121°C y 1atm de presión.
- Tomar una muestra de cada vial con el asa y agitar en la solución salina con las condiciones de asepsia adecuadas.
- Colocar unas gotas de la cepa en suspensión en cada pocillo de las pruebas de identificación.
- Colocar los reactivos de acuerdo a lo señalado en el protocolo de las pruebas.
- Comparar los colores con la tabla de colores y anotar los resultados.
- Insertar el código en el software y anotar el resultado.



**Fotografía N° 7: Adición de reactivos en la pruebas de identificación**



**Fotografía N° 8: Comparación de colores con las pruebas de identificación**

### **3.7. Masificación**

#### **3.7.1. Objetivo**

Elaborar el protocolo para la masificación del consorcio bacteriano.

#### **3.7.2. Materiales**

- Erlenmeyer 2000mL
- Papel aluminio
- Cinta parafilm
- Algodón
- Manguera de pecera
- Espátula
- Mechero de alcohol

- Guantes de látex
- Fósforos
- Tubos tapa rosca
- Gradilla

### **3.7.3. Equipos**

- Balanza digital
- Reverbero
- Motor para oxigenación
- Autoclave
- Cámara de flujo horizontal

### **3.7.4. Sustancias y reactivos**

- Agua destilada
- Alcohol
- Peptona
- Cloruro de sodio
- Sulfato de magnesio
- Fosfato ácido de potasio
- Cloruro de amonio
- Fosfato ácido di potásico
- Glucosa
- Peptona
- Extracto de levadura
- Mix de metales

### **3.7.5. Procedimiento**

- Preparar el medio de cultivo y esterilizarlo a 121°C y 1atm de presión.
- Colocar las cepas activadas en el medio de cultivo.
- Poner un tapón de algodón con las mangueras y conectar al motor para que se oxigene.
- Incubar durante 24 horas.
- Tomar una muestra de las cepas cultivadas en el medio.
- Realizar diluciones sucesivas hasta la - 8.
- Sembrar en el Petri film con la ayuda de la pipeta automática e incubar por 24h a 35.5°C.
- Realizar el conteo microbiológico.



**Fotografía N° 9: Masificación**

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a los análisis físico químicos realizados, se indica que en la laguna San Antonio existe contaminación por metales pesados, por ello se dio lugar a la obtención de un consorcio bacteriano nativo del sedimento de la misma, puesto que en nuestra ciudad no existen estudios sobre obtención de consorcios bacterianos provenientes de sedimentos lacustres, esta es la primera vez que se realiza una investigación de este tipo.

#### 4.1. Línea Base

##### 4.1.1. *Caracterización del Componente Ambiental Físico (Abiótico)*

##### 4.1.1.1. *Características de los cantones que conforman la laguna de San Antonio*

- **Cantón Riobamba**

Ocupa parte de la hoya del río Chambo y de las vertientes internas de las cordilleras Oriental y Occidental de Los Andes, lugar donde está la llanura Tapi, sobre la cual se levanta la ciudad. Riobamba se encuentra dividida en 28 zonas. (5)

- **Provincia:** Chimborazo
- **Población:** 263.412 habitantes
- **Límites:** El cantón Riobamba está limitado al Norte por los cantones Guano y Penipe; al Sur por los cantones Colta y Guamote; al Este por el cantón Chambo y la provincia de Morona Santiago; y, al Oeste por la provincias de Bolívar y Guayas.(5)
- **Temperatura promedio:** La ciudad de Riobamba está ubicada a 2.754 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio es de 14° C. Las más altas temperaturas registradas corresponden al mediodía con 23° C.(5)
- **Superficie:** 2900 hectáreas de área urbana.
- **Parroquias:** Las parroquias rurales que forman parte del cantón Riobamba son: Cacha, Calpi, Cubijíes, Flores, Licán, Licto, Pungalá, Punín, Químiag, San Juan, San Luis.(5)

- **Cantón Guano**

Guano es una ciudad cuna de gran actividad artesanal y trabajo en la provincia por la labor incansable de su gente, situada a 8 kilómetros al norte de Riobamba. (10)

- **Provincia:** Chimborazo
- **Población:** 42.73 habitantes
- **Temperatura Promedio:** entre 16°C y 18°C
- **Superficie:** 460.4 Km<sup>2</sup>
- **Parroquias:** Cuenta con 11 parroquias, 2 Urbanas: La Matriz y el Rosario y 9 parroquias rurales: San Andrés, San Isidro, Ilapo, San Gerardo, Guanando, San José de Chazo, Santa Fe de Galán, La Providencia y Valparaíso. (10)



#### **4.1.1.2. Ubicación geográfica**

Se encuentra ubicada dentro de la ciudad de Riobamba, en una zona urbanizada. Sus coordenadas geográficas son:

**Cuadro N° 4: Coordenadas geográficas**

<b>LATITUD (X)</b>	<b>LONGITUD (Y)</b>	<b>ALTITUD (Z)</b>
0762654	9817461	2362

**FUENTE:** DR. ERAZO, R.; CAZORLA, E.

#### **4.1.1.3. Hidrografía**

La ciudad de Riobamba forma parte de la cuenca hidrográfica del río Chambo; sus ríos son cortos y a su vez tienen corrientes fuertes debido a los desniveles que existen en el suelo. El río Chambo es el eje hidrográfico y de mayor importancia, puesto que sus aguas son usadas en varias actividades como son el consumo humano y para irrigar las zonas bajas y secas. Además existe la presencia de otros ríos que son afluentes, estos tienen caudales menores que son mantenidos por quebradas y vertientes que incrementan su caudal durante la época de lluvias. (5)

En su mayoría estos ríos suelen ser correntosos, de aguas límpidas y libres de contaminantes, con excepción de los ríos Chambo y Chibunga. Los ríos que podemos encontrar en la ciudad de Riobamba son: Ganquis, Tililag, Chimborazo, Calera, Chibunga, Chambo, Guano, Taullín, Blanco, Collantes, Tiaco Chico, Tiaco Grande, Chiniloma, Paylacajas, Daldal, Ishpi, Maguaso, Alao, Cuychi, Quilimas, Zanampala, Guargualla y Shayhua. (5)

#### 4.1.1.4. *Clima*

El clima de la ciudad Riobamba no tiene una marcada regularidad, sin embargo, pueden establecerse dos períodos: el verano, de agosto a enero, con presencia de vientos fuertes, sol intenso durante el día y frío durante las noches, el invierno, de febrero a julio, con temporadas lluviosas, si se lo puede definir el clima imperante en la zona de estudio es durante la mayor parte del tiempo Mesotérmico húmedo a semi húmedo. (5)

Los vientos de esta ciudad son capaces de producir una sensación térmica de bajas temperaturas, en ciertas épocas del año, la temperatura diaria puede variar de los 11°C a 19°C, muy rara vez se han registrado temperaturas mayores a los 24 °C, en cuanto a las precipitaciones se tiene un promedio anual de 425mm. (5)

**Tabla N° 2: Parámetros climáticos promedio de Riobamba**

Climatología													
Mes	En	Fe	Ma	Ab	Ma	Ju	Ju	Ago	Se	Oc	No	Di	Anual
Temperatura máxima registrada (°C)	24	23	24	26	23	25	23	24	23	23	24	23	<b>24</b>
Temperatura diaria máxima (°C)	19	19	20	21	19	19	20	19	19	19	20	20	<b>19</b>
Temperatura diaria mínima (°C)	13	10	10	13	10	10	11	8	11	11	12	12	<b>11</b>
Temperatura mínima registrada (°C)	1	1	-2	-4	0	0	-3	-1	2	0	0	1	<b>-1</b>
Precipitación (mm)	25	45	52	51	30	38	16	17	29	48	46	28	<b>425</b>

**FUENTE:** Anuario meteorológico 2010 INAMHI

#### 4.1.1.5. *Hidrología*

Dentro de la clasificación de ríos podemos describir a los más importantes:

- **El río Chibunga.-** Este río nace de la unión de los ríos Chimborazo y Calera a 3.238msnm. Este se dirige de noroeste a sureste. Posee una distancia aproximada de 31km. Y en parte sirve de límite con el cantón Colta. Este río es afluente del río Chambo. En la actualidad sus aguas se encuentran contaminadas, con la donación del 25% del impuesto a la renta se logró llevar a cabo el proyecto del Parque Lineal Chibunga y a su vez se dio lugar a la creación del fondo ambiental para la recuperación de las aguas del río y áreas verdes, mejorando el ambiente. (10)
- **El río Chambo.-** Tiene su nacimiento en el sistema lacustre de Ozogoché, en las lagunas Cubillín, y Magtayán con el nombre de río Ozogoché, se encuentra a 3.730msnm y al recibir al Atillo y Yasipán forma el río Cebadas. (10)

Después de la afluencia de los ríos: Tingo, Guamote y Guargualla toman el nombre de río Chambo. Otros afluentes son Alao, Ishpi, Daldal, Ulpán, Chibunga, Guano, Taullín, Blanco, Badcahuán y Puela, rompe el nudo de Igualata Sanancajas y encontrándose en la provincia de Tungurahua se une con el río Patate, forma el río Pastaza y se dirige a la Amazonía. En gran parte de su recorrido este río es correntoso, su caudal suele aumentar en época de lluvia, en los valles forman algunas terrazas, meandros y hermosas playas. Tiene un recorrido de sur a noreste, dando un total longitudinal de 140 km de recorrido, de los cuales 42 km son pertenecientes al cantón Riobamba, cuando este río pasa por la ciudad de Riobamba, sus aguas son tranquilas, forma varias curvas y hermosas playas siendo estas aptas para el turismo. (10)

#### **4.1.1.6. Nivel freático**

De acuerdo a las características geológicas de esta zona, el nivel freático se encuentra a una profundidad entre los 20 y 30 metros, a profundidades menores a estas, no se ha logrado observar la presencia de agua. (10)

#### **4.1.1.7. Geología**

Los suelos de esta zona son de origen volcánico, dentro de los cuales existe un predominio de los tipos entisol y molisol, en esta área el suelo está relacionado con la actividad volcánica del cuaternario reciente y de los volcanes cercanos como es el caso del Chimborazo. (10)

Los suelos de tipo entisol son el resultado de la desintegración de depósitos volcánicos piroclásticos de grano fino a medio-arena-limoso, su coloración va de café claro a oscuro, denominando a estos suelos también como podzoles. (10)

Los suelos de tipo molisol se encuentran en zonas de pastizales, estos son ricos en materia orgánica, por ende su coloración es café oscuro a negro, su granulación es de tipo medio a fino-limo arenoso-arcilloso, a su vez se caracterizan por contener humus y ya que posee humedad está relacionado con los andisoles. (10)

#### **4.1.1.8. Geomorfología**

Esta zona regionalmente corresponde a la depresión Interactiva, posee ciertos rasgos morfológicos por lo que pertenece a un hundimiento tectónico concreto debido a fallas longitudinales de dirección general N-S, que consecutivamente

ha sido afectada por distintos episodios volcánicos, originando fases acumulativas para después ser disecadas por fenómenos como la erosión fluvial. (10)

La altiplanicie de Tapi, que va desde los 2500 a 3000m.s.n.m, donde se encuentra asentada la ciudad de Riobamba muestra en su mayoría pequeñas colinas que tienen cimas redondeadas y zonas planas. (10)

Su morfogénesis se encuentra relacionada con las distintas etapas de relleno y depósitos de materiales detríticos en su basamento, los cuales posteriormente fueron cubiertos por poderosos depósitos volcánicos derivados del Chimborazo, de tipo nube ardiente y además por flujos de lava, uno de los cuales llegó inclusive relativamente cerca de la localidad de Guano. (10)

Posteriormente estos materiales fueron fosilizados por depósitos piroclásticos predominantemente fundados por ceniza volcánica. Hacia el norte del río Guano y su conjunto de formas aluviales delimita la planicie de Tapi, mientras que hacia el sur esta planicie es limitada por un sistema de terraza causado por la actividad volcánica y acción fluvial preponderante del río Chambo. (10)

#### **4.1.1.9. *Uso del suelo***

Por sus características bioclimáticas se ha determinado que un 70% es de suelo cultivable es de ciclo corto y un 30% de suelo erosionado, por tal razón, es un suelo con un alto potencial agrícola, pecuario y forestal. (10)

#### **4.1.1.10. *Calidad del agua de la Laguna San Antonio***

- **Sitios de estudio**

Se realizó un monitoreo de dos sitios de estudio: En cada uno de los sitios se tomaron datos de información geográfica como coordenadas geográficas (UTM) y altitud con un GPS.

Las coordenadas son: A4 17M 0762754/9817317. A3 17M 0762654/9817461

- **Mediciones físico-químicas**

En cada punto se midió in situ la temperatura, conductividad, pH y el oxígeno disuelto utilizando un medidor Multi-paramétrico.

**Tabla N° 3: Análisis de aguas de la laguna de San Antonio. Código LAB-A2082-13**

PARAMETROS	UNIDAD	RESULTADO
*Oxígeno disuelto	mg/L	2.60
Potencial de hidrogeno	Unidades de pH	7.81
Conductividad eléctrica	uS/cm	710.0
Temperatura	°C	18.9
DBO5	mg/L	6
DQO	mg/L	19
*Alcalinidad	mg/L	450
Turbidez	NTU	0.38
*Acidez	mg/L	232
Sólidos Totales Disueltos	mg/L	348
Bario	mg/L	<1
*Arsénico	mg/L	<0.005
Cadmio	mg/L	<0.04
Cobre	mg/L	<0.02
Fosforo	mg/L	<1.7
Hierro	mg/L	<0.2
*Manganeso	mg/L	<0.05
Níquel	mg/L	<0.2
Plomo	mg/L	<0.3
Vanadio	mg/L	0.74
Zinc	mg/L	<0.05

**FUENTE:** LAB CESTTA 25/07/2013

**Tabla N° 4: Análisis de aguas de la laguna de San Antonio. Código LAB-A2083-13**




<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>RESULTADO</b>
*Oxígeno disuelto	mg/L	2.31
Potencial de hidrogeno	Unidades de pH	7.77
Conductividad eléctrica	uS/cm	813.0
Temperatura	Oc	18.8
DBO5	mg/L	6
DQO	mg/L	16
*Alcalinidad	mg/L	480
Turbidez	NTU	0.47
*Acidez	mg/L	243
Sólidos Totales Disueltos	mg/L	398
Bario	mg/L	<1
*Arsénico	mg/L	<0.005
Cadmio	mg/L	<0.04
Cobre	mg/L	<0.02
Fosforo	mg/L	<1.7
Hierro	mg/L	<0.2
*Manganeso	mg/L	<0.05
Níquel	mg/L	<0.2
Plomo	mg/L	<0.3
Vanadio	mg/L	<0.5
Zinc	mg/L	<0.05

**FUENTE:** LAB CESTTA 25/07/2013






#### 4.1.2. Caracterización del Componente Ambiental Biológico (Biótico)





##### 4.1.2.1. Flora





Cuadro N° 5: Lista de taxones de flora de la laguna San Antonio

PLANTAS			
Familia	Género	Especie	Nombre Común
Asteraceae	<i>Ambrosia</i>	<i>Arborescens</i>	Altamisa/marco 
Asteraceae	<i>Taraxacum</i>	<i>Officinale</i>	Taraxaco 
Asteraceae	<i>Baccharis</i>	<i>Latifolia</i>	Chilca 



Cyperaceae	<i>Scirpus</i>	<i>Californicus</i>	Totora 
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>	<i>sp1</i>	Calabaza 
Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>Crinitipes</i>	Pungal 
Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>Nigrescens</i>	Hierba mora 
Solanaceae	<i>Physalis</i>	<i>Peruviana</i>	Uvilla 

Poaceae	<i>Cortaderia</i>	<i>Nítida</i>	<p>Sigse</p> 
Rosaceae	<i>Rubus</i>	<i>Adenotrichos</i>	<p>Mora</p> 
Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>Serótina</i>	<p>Capulí</p> 
Agavaceae	<i>Agave</i>	sp1	<p>Penco</p> 





Lamiaceae	<i>Mentha</i>	sp1	Menta 
Fabaceae	<i>Trifolium</i>	sp1	Trébol 
Poaceae	<i>Zea</i>	Mays	Maíz 
Chenopodaceae	<i>Chenopodium</i>	Quinoa	Quinua 






**FUENTE:** Dr. Erazo, R.; Cazorla, E.




#### 4.1.2.2. Fauna

- Avifauna

**Cuadro N° 6: Lista de taxones de avifauna de la laguna San Antonio**

AVES			
Familia	Genero	Especie	Nombre Común
Emberizadae	<i>Zonotrichia</i>	<i>Capensis</i>	Chingolo 
Falconide	<i>Falco</i>	<i>Sparverius</i>	Quilico 
Turdidae	<i>Turdus</i>	<i>Fuscater</i>	Mirlo grande 
Columbidae	<i>Columba</i>	<i>Livia</i>	Paloma 

Tyrannidae	<i>Pyrocephalus</i>	<i>Rubinus</i>	Pájaro brujo 
Ardeidae	<i>Butorides</i>	<i>Striata</i>	Garcita estriada 
Caprimulgidae	<i>Zenaida</i>	<i>Auriculata</i>	Tórtola 
Apodidae	<i>Streptoprocne</i>	sp1	Vencejos 
Trochilidae	<i>Colibri</i>	<i>Coruscans</i>	Colibrí 



Trochilidae	<i>Lesbia</i>	<i>Victoriae</i>	Colibrí colilargo 
Cardinalidae	<i>Pheucticus</i>	<i>Chrysogaster</i>	Huirac-churo 
Fringilidae	<i>Carduelis</i>	sp1	Jilguero 

**FUENTE:** Dr. Erazo, R.; Cazorla, E.



- **Mastofauna**


**Cuadro N° 7: Lista de taxones de mastofauna de la laguna San Antonio**

MAMÍFEROS			
Familia	Genero	Especie	Nombre Común
Canidae	<i>Canis</i>	<i>lupus familiaris</i>	Perro 
Bovidae	<i>Bos</i>	<i>Taurus</i>	Vaca 

**FUENTE:** Dr. Erazo, R.; Cazorla, E.

- **Herpetofauna**

**Cuadro N° 8: Lista de taxones de herpetofauna la laguna San Antonio**

REPTILES Y ANFIBIOS			
Familia	Genero	Especie	Nombre Común
Dactyloidae	<i>Anolis</i>	sp1	Lagartija 

Amphignathodontidae	<i>Gastrotheca</i>	<i>Riobambae</i>	Rana marsupial 
---------------------	--------------------	------------------	---

**FUENTE:** Dr. Erazo, R.; Cazorla, E.

#### 4.1.3. Demografía

El cantón Riobamba tiene el 48% del total de la población de la provincia de Chimborazo contando con 403.632 habitantes, siendo así el 53% de la población femenina y el 47% restante población masculina. (13)

De acuerdo al censo realizado en el 2010, el cantón Riobamba presenta las siguientes características:

**Tabla N° 5: Datos demográficos del cantón Riobamba**

DESCRIPCIÓN	N° DE PERSONAS
Población total	225741
Población masculina	118901
Población femenina	106840
Edad media de la población (años)	28.7
Tasa de crecimiento anual (%):	3
Promedio de hijos por hogar	1.9 hijos
Promedio de personas por hogar	4.5 personas

**Fuente:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos 2010



Adicionalmente, un fenómeno demográfico muy significativo es la creciente urbanización de la población del cantón, como se aprecia en el cuadro siguiente:

**Tabla N° 6: Población urbana y rural**

<b>AÑO</b>	<b>URBANO</b>	<b>RURAL</b>
1982	49.68%	50,32%
1990	57.70%	42,30%
2001	64.56%	35,44%
2010	65%	35%

**FUENTE:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

#### **4.1.4. Economía**

- **Actividades económicas**

Riobamba es el centro comercial de la provincia, sin embargo, en todas las cabeceras cantonales y en algunas parroquias se llevan a cabo ferias, generalmente las actividades económicas suelen basarse en la producción agropecuaria. (20)

El comercio cuenta con algunas empresas grandes como la Cemento Chimborazo, PROLAC, TUBASEC, Hornos Andino, HELO, etc. Subsiste la industria harinera, cuyas actividades comerciales se realizan con las provincias de la Sierra y Costa; algunos productos se envían al exterior. (20)

También la artesanía es otra de las actividades económicas de gran importancia, representada por la producción de calzado, ropa, alfombras, chompas y otros tejidos, los mismos que son elaborados en Guano y Penipe; la fabricación de tejas y ladrillos se lleva a cabo en Chambo. Los pobladores se

dedican en su totalidad a la crianza de cuyes, conejos y la siembra de papas, habas, cebada, melloco, trigo, maíz y otros vegetales. (20)

- **El empleo y la población económicamente activa (PEA)**

**Tabla N° 7: Población económicamente activa**

Cantón	Área	Sexo	PEA total	%	%
Riobamba	Rural	Hombres	16050	21.28%	36.33%
	Rural	Mujeres	11355	15.05%	
	Urbana	Hombres	27825	36.89%	63.67%
	Urbana	Mujeres	20194	26.77%	
	<b>Total</b>		<b>75.424</b>	<b>100.00%</b>	

**FUENTE:** Sistema Integrado de Indicadores Sociales del Ecuador. (SIISE). Versión 3,5  
2002

#### **4.1.5. Interés Humano**

- **Educación**

El porcentaje de analfabetismo para el cantón Riobamba es de 11.6 % de la población. Se puede notar claramente la diferencia entre la población analfabeta masculina y femenina: el 7.4% para los hombres y el 15% para las mujeres. Se puede estimar que la escolaridad promedio es de 7.9 años por persona, en el caso de la población masculina es de 8.4 y 7.4 años para la población femenina. (20)

Con respecto al grado de instrucción, el 71.1% de las personas han culminado la primaria, el 29.6% han estudiado toda la secundaria y el 24.3% han recibido instrucción superior. También se ha podido visualizar una mejora asombrosa durante el lapso de estos años ya que el cantón se ha desarrollado en el ámbito escolar en gran cantidad. Tomando en cuenta estos indicadores, se considera que el índice multivariado de educación es del 73.7%, durante estos últimos años el cantón Riobamba tiene un nivel de vida elevado. (20)

**Tabla N° 8: Indicador de educación por sexo**

<b>EDUCACIÓN – POBLACIÓN</b>	
INDICADOR	<b>%(15 años y más)</b>
Analfabetismo	11.6%
Analfabetismo hombres	7.4%
Analfabetismo mujeres	15.0%
Analfabetismo funcional	20.6%
Analfabetismo funcional hombres	16.2%
Analfabetismo funcional mujeres	24.2%
INDICADOR	<b>Años de estudio</b>
Escolaridad	7.9
Escolaridad hombres	8.4
Escolaridad mujeres	7.4
INDICADOR	<b>%(12 años y más)</b>
Primaria completa	71.1%
Primaria completa hombres	75.9%
Primaria completa mujeres	67.2%
INDICADOR	<b>%(18 años y más)</b>
Secundaria completa	29.6%
Secundaria completa hombres	31.7%
Secundaria completa mujeres	28.0%
INDICADOR	<b>%(24 años y más)</b>
Instrucción superior	24.3%
Instrucción superior hombres	26.6%
Instrucción superior mujeres	22.5%
<b>EDUCACIÓN - COBERTURA Y ACCESO</b>	
INDICADOR	<b>%( 5 a 14 años)</b>
Tasa bruta de escolarización básica	112.0%
Tasa bruta de escolarización básica - hombres	112.6%
Tasa bruta de escolarización básica - mujeres	111.4%
INDICADOR	<b>%( 6 a 11 años)</b>
Tasa bruta de escolarización primaria	124.6%
Tasa bruta de escolarización primaria hombres	124.4%
Tasa bruta de escolarización primaria mujeres	124.8%
INDICADOR	<b>%( 12 a 17 años)</b>
Tasa bruta de escolarización secundaria	79.9%
Tasa bruta de escolarización secundaria - hombres	83.1%

Tasa bruta de escolarización secundaria - mujeres	76.9%
INDICADOR	%( 18 a 24 años)
Tasa bruta de escolarización superior	44.3%
Tasa bruta de escolarización superior - hombres	44.8%
Tasa bruta de escolarización superior - mujeres	43.9%
INDICADOR	%( 5 a 14 años)
Tasa neta de escolarización básica	89.5%
Tasa neta de escolarización básica - hombres	90.4%
Tasa neta de escolarización básica - mujeres	88.6%
INDICADOR	%( 6 a 11 años)
Tasa neta de escolarización primaria	94.0%
Tasa neta de escolarización primaria - hombres	94.2%
Tasa neta de escolarización primaria - mujeres	93.7%
INDICADOR	%( 12 a 17 años)
Tasa neta de escolarización secundaria	56.9%
Tasa neta de escolarización secundaria - hombres	59.0%
Tasa neta de escolarización secundaria - mujeres	54.8%
INDICADOR	%( 18 a 24 años)
Tasa neta de escolarización superior	24.8%
Tasa neta de escolarización superior - hombres	24.8%
Tasa neta de escolarización superior - mujeres	24.8%
INDICADOR	%
Tasa de escolarización 5 a 14 años	89.9%
Tasa de escolarización 5 a 14 años - hombres	90.8%
Tasa de escolarización 5 a 14 años - mujeres	88.9%
Tasa de escolarización 6 a 11 años	94.5%
Tasa de escolarización 6 a 11 años - hombres	94.8%
Tasa de escolarización 6 a 11 años - mujeres	94.3%
Tasa de escolarización 12 a 17 años	77.0%
Tasa de escolarización 12 a 17 años - hombres	79.8%
Tasa de escolarización 12 a 17 años - mujeres	74.4%
Tasa de escolarización 18 a 24 años	44.4%
Tasa de escolarización 18 a 24 años - hombres	45.6%
Tasa de escolarización 18 a 24 años - mujeres	43.4%

**FUENTE:** Sistema Integrado De Indicadores Sociales Del Ecuador, SIISE 4.5

- **Empleo**

La población que se encuentra en edad de trabajar es de 143.58 teniendo una tasa bruta de participación laboral del 39%. (20)

**Tabla N° 9: Índice de empleo**

<b>EMPLEO OFERTA LABORAL</b>	
<b>INDICADOR</b>	<b>Nº</b>
Población en edad de trabajar (PET)	143.58
Población económicamente activa (PEA)	75.424
<b>INDICADOR</b>	<b>%</b>
Tasa bruta de participación laboral	39.0%
Tasa global de participación laboral	52.5%
<b>TRABAJO INFANTIL Y ADOLESCENTE</b>	
<b>INDICADOR</b>	<b>%</b>
Niños/as que trabajan y no estudian de 8 a 17 años	8.9%
Niños/as que no trabajan ni estudian de 8 a 17 años	6.6%
Niños/as que no trabajan y sí estudian de 8 a 17 años	81.1%
Niños/as que trabajan y estudian de 8 a 17 años	3.4%

**FUENTE:** Sistema Integrado De Indicadores Sociales Del Ecuador, SIISE 4.5

- **Vivienda y servicios básicos**

Dentro del cantón Riobamba existen 48.966 hogares y 48.668 viviendas, de los cuales se estima que un 95% poseen vivienda propia, por lo que, cuantitativamente no hay un déficit de viviendas. (4)

Sin embargo, el 19% de la población reside en viviendas que tienen características físicas inadecuadas (3.2% en el área urbana y 47.8 en el área rural), y finalmente el 33% de la población habita en viviendas que carecen de servicios adecuados (6% en el área urbana y 82% en el área rural. (4)

En cuanto al tipo de tenencia de las viviendas, se sabe que el 66% son propias, el 26% son arrendadas, y el 8% restante tienen otras formas de adquisición (anticresis, gratuita, por servicios). Si la población total del cantón es de 193.315 habitantes, da como resultado un promedio de 4 personas por vivienda. De los datos se deduce que aproximadamente 16.400 hogares no cuentan con vivienda propia. (4)

Se puede notar que en cuanto a viviendas existe un alto déficit de los servicios residenciales pero realizando una comparación con años anteriores ha disminuido, de igualmente se ha incrementado el servicio telefónico y eléctrico, donde se puede notar el crecimiento de dicho Cantón. (4)

En cuanto a los hogares, se puede notar que las condiciones de hacinamiento ha disminuido puesto que actualmente tiene el 17.4%. En cambio sí se refiere al uso de gas o electricidad se ha incrementado, ya que en el momento existe el 77.2%, considerándose el 22.3% el uso de leña o de carbón. Por tales razones se ha podido hacer notorio que ha habido un incremento en el nivel de vida de dicho cantón en lo cuanto a los sus servicios básicos y vivienda. (4)

De acuerdo a estos indicadores, se cree que el índice multivariado de infraestructura básica es apenas de un 45.9%, existiendo aún un porcentaje elevado de hogares insatisfechos. (4)

- **Agua potable**

El 81.4% de las viviendas del cantón Riobamba es abastecido de agua por medio de la red pública; en las zonas urbanas, este medio de abastecimiento es casi completo, puesto que llega al 97% de las viviendas, en cambio en las zonas rurales apenas algo más de la mitad de las viviendas se abastece a través de la red pública. (4)

- **Salud**

Se estima que el índice de oferta en salud (centros médicos, profesionales de salud, infraestructura básica, etc.) en este cantón es de 55% por lo cual no se ha dado un incremento en gran cantidad ya que apenas es el 2%, lo cual refleja

que la calidad de la oferta en salud es muy deficiente, a pesar de que es más grande que el resto de las provincias. (20)

A continuación se encuentran otros indicadores:

**Tabla N° 10: Índices de salud**

<b>SALUD DE LA NIÑEZ</b>	
<b>INDICADOR</b>	<b>VALOR</b>
Tasa de mortalidad infantil (método directo Tasa por 1.000 nacidos vivos)	17.8
Establecimientos de salud con internación	13
Dispensarios médicos, centros, subcentros y puestos de salud	55
Médicos/ as en establecimientos públicos y privados	420
Odontólogos/as en establecimientos públicos y privados	57
Obstetricias/ en establecimientos públicos y privados	13
enfermeros/ as en establecimientos públicos y privados	182
Auxiliar/ de enfermería en establecimientos públicos y privados	262

**FUENTE:** Sistema Integrado De Indicadores Sociales Del Ecuador, SIISE 4.5

- **Pobreza**

Riobamba tiene índices de pobreza menores que el resto de la provincia, y del mismo modo que el promedio del país. Sin embargo, aunque la pobreza no es tan aguda como en otros lugares, no deja de ser un problema considerable, puesto que, aproximadamente la mitad de su población tiene insatisfechas sus necesidades básicas, con respecto a la relación de sus ingresos, y cerca de la cuarta parte sufre pobreza extrema. (20)

- **Arqueología**

Dentro de la provincia de Chimborazo existen muy pocos sitios que sobresalgan por su importancia arqueológica o por ser testimonios de

tradiciones de los habitantes antiguos de la región. Uno de estos sitios es el Templo de Machay, esta es una extraña formación rocosa con una pequeña cueva, ubicada a 4.800 metros de altitud, donde se cree que los antiguos Puruhaes llevaban a cabo sacrificios de llamas y mujeres jóvenes a su deidad principal: el Chimborazo. (13)

Existen otros sitios arqueológicos, siendo estos aún muy poco estudiados y documentados, se encuentran en las comunidades de Pulinguí-San Pablo y Chorrera Mirador Alto, en el lado sur de la reserva. (13)

Estos lugares, al igual que otros que se encuentran localizados fuera de la reserva, aparentemente fueron utilizados como sitios ceremoniales para viviendas de los señores principales tanto del pueblo Puruhá como de los Incas que posteriormente conquistaron estas tierras. Sin duda alguna estas zonas caracterizadas por la fertilidad de la tierra alrededor del Chimborazo y Carihuairazo, por la estratégica ubicación de varios cerros a su alrededor (como el Puñalica, junto al Carihuairazo, o el Gallo Rumi, al sureste del Chimborazo) y por la importancia mitológica de ambos volcanes, actualmente pertenecen a la provincia de Chimborazo, a su vez estos fueron el albergue de importantes asentamientos puruhaes e incas. Además, de acuerdo con algunos historiadores se cree que los páramos del Chimborazo servían para abastecerse de animales de cacería, para la cría de llamas y también para la recolección de ciertas plantas útiles como fibras, medicina, alimentación y rituales. (13)

No obstante, los principales centros arqueológicos de la provincia se encuentran fuera de esta, generalmente hacia el sur. Existieron dos sitios de vital importancia, próximos a la reserva, estos fueron Licán y Macají. Se cree que Licán fue el sitio elegido por Wayna Kapak para asentar su residencia de descanso en los recorridos que existen entre Quito y Tomebamba. De Macají, en cambio, se dice que fue un cementerio perteneciente a los Incas, aunque también pudo pertenecer a los Puruhaes o inclusive de algún otro pueblo. Aquí se levanta un montículo regular de 8m de alto sobre una ancha plataforma. (13)



De acuerdo a investigaciones realizadas por Jijón y Caamaño asegura que Macají fue una tola donde se hallaron muchos objetos de cobre, incluyendo placas y petacas, similares a los descubiertos en algunas tolas de Manabí. (13)

En el cantón Alausí, a varios kilómetros al sur de la reserva, se encuentra la mayor riqueza arqueológica, de acuerdo con un documento del Ministerio Coordinador de Patrimonio Natural y Cultural, puesto que en este cantón se encuentran aproximadamente 71 yacimientos arqueológicos. Pero este no es el único sitio de importancia. Más cerca de la RPF Chimborazo, en la comuna Alacao, junto a la ciudad de Guano, existe un importante yacimiento arqueológico. Tristemente, este yacimiento está siendo saqueado para vender las piezas de cerámica e incluso de oro a coleccionistas privados. Pese a esto, de acuerdo a testimonios de funcionarios del Municipio de Guano, se presume que en Alacao aún quedan diferentes tolas sin excavar, donde sin duda habrán maravillas por descubrir. (13)

También otro sitio que merece mención especial, a pesar de no estar dentro de la RPF Chimborazo, es Punín, que se encuentra cerca de otra histórica población, Cacha, y no muy lejos de Chambo. La quebrada de Chalán, en Punín, es el sitio paleontológico de mayor significancia del Ecuador andino. Esto se debe a que es el sitio donde se han hecho los descubrimientos más importantes de restos fósiles, siendo estos superados únicamente por el magno Bosque Protector Petrificado de Puyango, que se halla en los límites entre Loja y El Oro. (13)

En Punín se ejecutó un descubrimiento muy importante y a su vez muy intrigante. Se trata de dos cráneos humanos muy antiguos, uno encontrado en 1.923, cuya antigüedad sería de 4.950 años, y otro encontrado en el año 1.974, siendo este un poco más “joven” ya que parece datar de hace 3.250 años. En esta misma quebrada han sido encontrados igualmente un sinnúmero de huesos de animales prehistóricos que tendrían aproximadamente dos millones de años de antigüedad. Entre los cuales se pueden destacar los mastodontes, armadillos gigantes y caballos andinos, todos lógicamente extintos. Probablemente estos grandes animales fueron habitantes también en las planicies y valles actualmente protegidos dentro de la reserva Chimborazo. (13)

- **Turismo**

Hace algún tiempo existe una esperanza creciente relacionada con las actividades turísticas, puesto que Riobamba, siendo la capital de esta provincia, forma parte del centro de la actividad turística de una gran parte de la misma. (4)

Sin embargo, las cifras revelan que, en términos globales de la economía del cantón, esta actividad es aún poco significativa. Entre los factores que se señalan como las principales falencias de este sector están:

- a. Los gremios no cubren a todos los posibles asociados para establecer una estrategia común para el desarrollo de los recursos naturales relacionados con el turismo.
- b. La empresa privada mantiene desacuerdos respecto de las políticas y propuestas sobre los atractivos turísticos a explotar.
- c. El sector turístico local apenas alcanza tener cubierto en promedio el 25% de las plazas hoteleras.
- d. Según la percepción del gremio de empresarios turísticos, las autoridades locales no preparan las condiciones que alienten las actividades turísticas.
- e. El sistema impositivo para estas actividades es muy elevado; en el costo de los servicios hay un incremento del 22% de impuestos.
- f. No existe especialización profesional de los operadores turísticos.
- g. No hay un valor agregado estratégico en relación con las obras y servicios de infraestructura pública necesarios. (4)

De acuerdo a la Línea Base realizada se puede notar claramente que Riobamba es una ciudad que se encuentra en progreso, puesto que no tiene

índices muy altos de pobreza y que tiene una población económicamente activa bastante aceptable, además posee lugares turísticos que llaman la atención de los visitantes como son los parques y museos. En cuanto al estado actual de la laguna San Antonio se puede observar que en ella habitan distintas especies de aves, mamíferos y reptiles, los cuales están en peligro, puesto que se presume la existencia de contaminación en el sedimento de la laguna por metales pesados de acuerdo a los análisis realizados, además en los alrededores de la laguna existen animales muertos y eutrofización trayendo problemas como las plagas y malos olores.

#### 4.2. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL SEDIMENTO

**Tabla N° 11: Resultados del análisis físico-químico del sedimento**

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
Aluminio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	10456,02	-
Arsénico	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<0,5	5
Plomo	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	12,84	25
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	256,25	250
Molibdeno	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	0,84	2
Níquel	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	18,08	20
Plata	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<0,5	-
Cadmio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<0,05	0,5
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	48,43	25
Boro	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	4,08	1
Zinc	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	84,45	60
Silicio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	84,85	-
Hierro	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	44290,35	-
Estroncio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	164,92	-
Litio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	9,84	-
Potasio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	829,71	-
Calcio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	28560,72	-
Cromo total	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	10,29	20

Selenio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<1	1
Cobre	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	36,33	30
Manganeso	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	1680,41	-
Estaño	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	0,97	5
Magnesio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	4755,12	-
Cobalto	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	11,11	10
Berilio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<1	-
Titanio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	984,13	-

**FUENTE:** LABCESTTA 12/12/2013

**Tabla N° 12: Resultados del análisis físico-químico del sedimento**

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE
Aluminio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	7130,00	-
Arsénico	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<0,5	5
Plomo	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	2,55	25
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	51,65	250
Molibdeno	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	1,44	2
Níquel	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	23,21	20
Plata	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<0,50	-
Cadmio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	0,1	0,5
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	41,76	25
Boro	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	8,56	1
Zinc	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	17,86	60
Silicio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	32,6	-
Hierro	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	11690	-
Estroncio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	79,50	-
Litio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<5,0	-
Potasio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	371,05	-
Calcio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	9505	-
Cromo total	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	19,09	20
Selenio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<1	1

Cobre	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	10,18	30
Manganeso	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	168,5	-
Estaño	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<1	5
Magnesio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	5525,00	-
Cobalto	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	10,23	10
Berilio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	<1	-
Titanio	PEE/LABCESTTA/174 EPA 200.7 / EPA 3015a ICP	mg/kg	619	-

**FUENTE:** LAB CESTTA 12/12/2013

Realizando la caracterización físico-química del sedimento de la laguna San Antonio mediante la comparación con la tabla de criterios de calidad del suelo del Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, hemos podido determinar que el boro (B) se encuentra en una concentración de 4,08ppm siendo el límite máximo permisible 1ppm, el vanadio (V) está en una concentración de 48,43ppm siendo el límite máximo permisible 25ppm, el bario (Ba) está en una concentración de 256,25ppm cuyo límite máximo permisible es 250ppm y el cobre (Cu) se encuentra en una concentración de 36,33ppm siendo el límite máximo permisible 30ppm.

#### **4.3. Obtención de cepas puras**

En la primera etapa se obtuvieron un total de 17 cepas puras, las cuales en su mayoría eran de tamaño grande, con bordes irregulares y de color crema. Además la mayoría de estas pertenecen al género *Bacillus*, siendo así bacilos grandes y bacilos pequeños debido a que son de tipo aerobio y este género provienen del suelo, agua y polvo, siendo igualmente Gram positivas, ya que tienen una pared celular gruesa de peptidoglicano que permite dar lugar a la retención de la coloración violeta.

Igualmente todas las cepas carecían de esporulación posiblemente por factores como la falta de luz o incluso puede ser parte de su ciclo reproductivo normal.

**Cuadro N° 9: Características macroscópicas y microscópicas de las cepas puras**

<b>Código</b>	<b>N° muestra</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Bordes</b>	<b>Superficie</b>	<b>Gram</b>	<b>Forma celular</b>	<b>Esporulación</b>
LS1-6C2-1	L1	Irregular	Crema	Mediana	Irregulares	Plana	+	Cocos	No
LS4C7-1 1	L2	Regular	Crema	Grande	Regulares	Plana	+	Bacilos pequeños	No
LS2C4,1-1,2,2,2	L3	Regular	Crema	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos pequeños	No
LS6C11-1,2,1-1	L4	Regular	Incolora	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos pequeños	No
LS7C18-1,1	L5	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Convexa	-	Bacilos pequeños	No
LS6C13-2,1,2,2-2	L6	Regular	Incolora	Grande	Regulares	Plana	+	Bacilos pequeños	No
LS7C17 -1,1	L7	Regular	Blanco	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos pequeños	No
LS6C13-1,1,2,2	L8	Regular	Blanco	Grande	Regulares	Plana	+	Bacilos grandes	No
LS6C13 -1,1,2,1a	L9	Regular	Crema	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos grandes	No
LS6C11-1,2-3b	L10	Regular	Blanquecino	Grande	Regulares	Plana	-	Bacilos pequeños	No
LS2-5C3-1	L11	Redonda	Amarillo	Pequeño	Regulares	Convexa	+	Cocos	No
LS5-4	L12	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Plana	-	Bacilos grandes	No
LS6C12-1,1,2,1	L13	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Convexo	+	Bacilos pequeños	No
LS6C11 1,2,2-2	L14	Regular	Incolora	Grande	Regulares	Plana	+	Bacilos grandes	No
LS7C16 -1,1	L15	Irregular	Blanca	Grande	Regulares	Convexa	+	Bacilos pequeños	No
LS2C4-1,2,2,1	L16	Regular	Crema	Grande	Regulares	Plana	+	Bacilos pequeños	No
LS6C12 2,2,1-1a	L17	Irregular	Crema	Grande	Irregulares	Plana	+	Bacilo pequeño	No

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

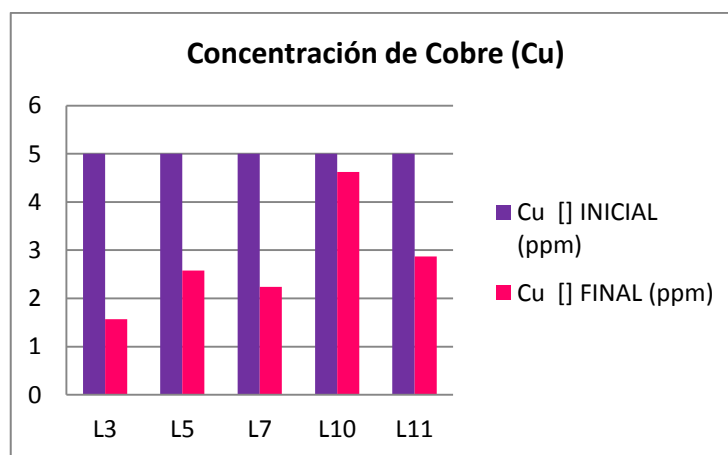
#### 4.4. Biosorción de metales pesados (Cu, Ba, V y B)

**Cuadro N° 10: Concentración de metales**

Metal	Concentración (ppm)
Bario	40
Boro	2
Cobre	5
Vanadio	6

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

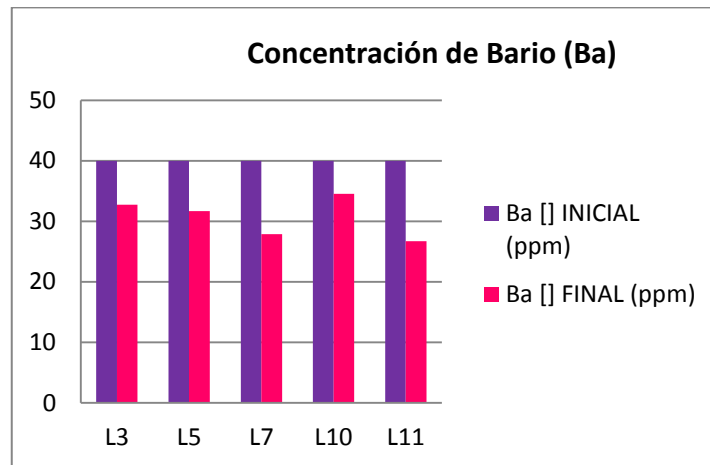
En la tabla N° 5 se encuentra la concentración a la cual fueron sometidas las cepas, en la prueba de reducción de contaminantes, esta fue determinada realizando un promedio entre los resultados de los análisis físico-químicos realizados.



**Gráfico N°1: Resultados de concentración inicial y final de cobre**

En el gráfico N° 1 se puede observar que la concentración inicial de cobre fue de 5ppm, de las cuales, la concentración final menor obtenida fue de 1.57ppm por la cepa L3 fue y la concentración final mayor obtenida fue de 4.62ppm por la cepa L10, lo cual quiere decir que tiene baja capacidad para la bioabsorción

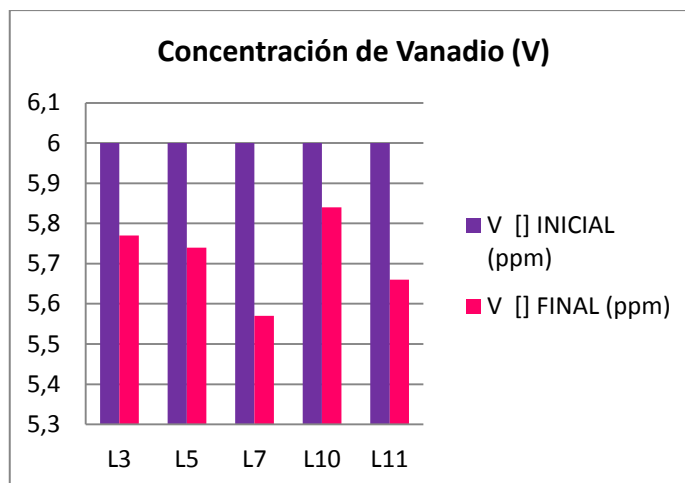
del mismo, en cuanto a las demás cepas podemos observar que tienen un buen rendimiento para bioabsorber cobre.



**Gráfico N° 2: Resultados de concentración inicial y final de bario**

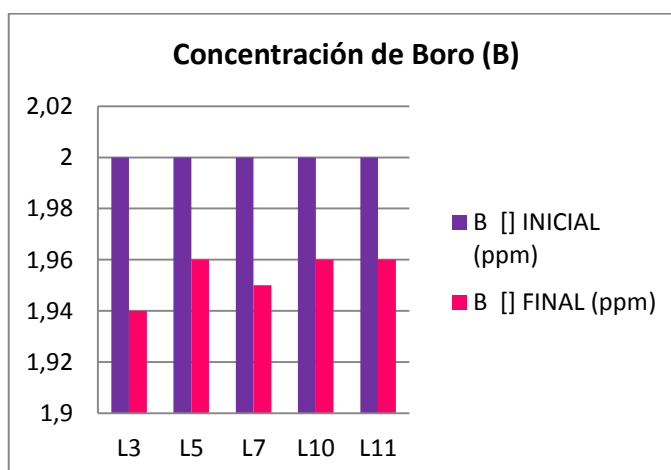
En el gráfico N° 2 se puede observar que la concentración inicial de bario fue de 40ppm, mientras que la concentración final por la bioabsorción de la cepa L7 fue de 27.88ppm, lo cual quiere decir que tiene mayor capacidad para bioabsorber bario, en cambio con la cepa L10 se obtuvo una concentración final de 34.54ppm dando como resultado una baja capacidad para bioabsorber el mismo, además se puede observar que las demás cepas tienen una capacidad bastante aceptable para bioabsorber este metal.





**Gráfico N° 3: Resultados de concentración inicial y final de vanadio**

En el gráfico N° 3 se pudo observar que la concentración inicial de vanadio a la cual se sometieron a las distintas cepas es de 6ppm, obteniendo una concentración final de 5.57ppm con la cepa L7 siendo esta la más baja, mientras que la concentración obtenida con la cepa L10 es de 5.84ppm la cual es la más alta de las concentraciones finales, lo que significa que esta cepa con respecto a las demás tiene una menor capacidad de biosorción de vanadio.



**Gráfico N° 4: Resultados de concentración inicial y final de boro**

En el gráfico N° 4 podemos observar que la concentración inicial de boro fue de 2ppm, mientras que la concentración final más baja fue la obtenida por la cepa L3 con un total de 1.94ppm, además se puede observar que las demás cepas tienen un rendimiento promedio dando una concentración final de 1.96ppm, lo cual quiere decir que tienen una capacidad baja para bioabsorber este metal.

#### **4.4.1. Prueba de reducción de contaminantes (mix de bacterias con mix de metales)**

Para llevar a cabo esta prueba, se tomaron las nueve cepas realizando así un mix de bacterias para posteriormente someterlas a tres tipos diferentes de concentraciones de metales, dando los siguientes resultados:

**Cuadro N° 11: Concentración de bario retenida por la biomasa**

<b>Bario (Ba)</b>	<b>Mix 1</b>	<b>Mix 2</b>	<b>Mix 3</b>
Concentración inicial (ppm)	40	20	60
Primera lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	27.58	12.03	41.16
Segunda lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	29.78	13.78	48.48

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

En el cuadro N° 11 se puede observar que en la primera lectura realizada a los siete días la mayor concentración de bario retenida por la biomasa es en el mix 3 con 41.16ppm y la concentración retenida más baja es de 12.03ppm en el mix 2, a su vez, podemos notar que dependiendo de la concentración a la cual sean sometidas las bacterias, estas tienen la capacidad de retener el metal en una concentración mayor al 50%. En cambio en la segunda lectura realizada a

los 15 días se puede observar que la capacidad de retener el metal puede aumentar, pero en un porcentaje menor, posiblemente porque esa es la capacidad máxima que poseen para biosorber el metal.

**Cuadro N° 12: Concentración de cobre retenida por la biomasa**

<b>Cobre (Cu)</b>	<b>Mix 1</b>	<b>Mix 2</b>	<b>Mix 3</b>
Concentración inicial (ppm)	5	2	7
Primera lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	0.31	0.19	0.53
Segunda lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	0.37	0.23	0.60

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

En el cuadro N° 12 se puede observar que en la lectura realizada a los siete días la concentración de cobre más alta retenida por la biomasa es en el mix 3 con 0.53ppm y la concentración más baja es de 0.19 en el caso del mix 2, en cambio en la lectura realizada a los 15 días la concentración retenida por la biomasa se incrementó pero no en un porcentaje significativo, puesto que fue de 0.60ppm en el mix 3 y 0.23 en el caso del mix 2, esto puede deberse a que las bacterias tienen una baja capacidad para biosorber este metal.

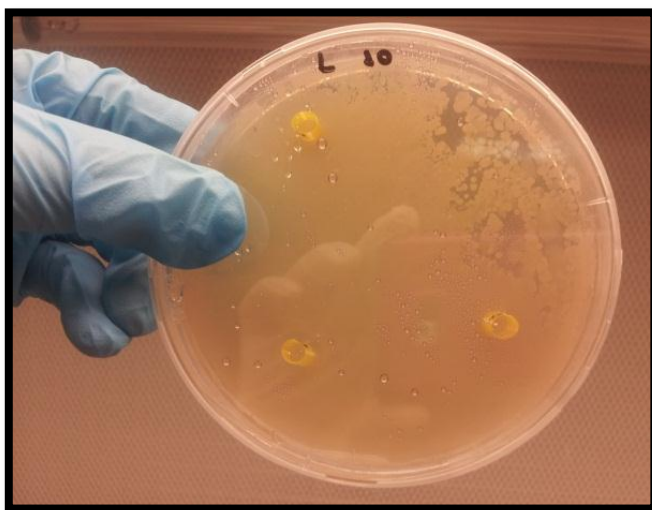
**Cuadro N° 13: Concentración de vanadio retenida por la biomasa**

<b>Vanadio (V)</b>	<b>Mix 1</b>	<b>Mix 2</b>	<b>Mix 3</b>
Concentración inicial (ppm)	6	3	9
Primera lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	0.30	0.13	0.38
Segunda lectura de la concentración retenida por la biomasa (ppm)	0.37	0.15	0.42

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2013

En el cuadro N° 13 se puede observar que la concentración de vanadio retenida por la biomasa a los siete días no es muy alta, pudiéndose notar que en el mix 3 la concentración de vanadio retenida es mayor que en los demás casos siendo esta de 0.38ppm tomando en cuenta que la concentración inicial es de 9ppm y la concentración más baja es de 0.13ppm obtenida en el mix 2 siendo 3ppm la concentración a la cual se sometieron las bacterias, de igual manera en la lectura realizada a los 15 días la concentración retenida por la biomasa se incrementa pero no de una manera significativa, puesto que para el mix 2 es de 0.15ppm y para el mix 3 es de 0.42ppm.

#### **4.5. Prueba de antagonismo**



**Fotografía N° 10: Prueba de antagonismo, cepa L10**

En la fotografía N° 10 se pudo observar que se coloca una cepa de fondo para llevar a cabo la prueba de antagonismo, razón por la cual se sometieron a la misma las cepas L3, L4, L5, L7, L9, L10, L11, L12 y L13, ya que son las cepas que pasaron la prueba de biosorción de metales. Estableciéndose que la cepa L13 es antagónica con la cepa L10 y que la cepa L11 es antagónica con la cepa L5, lo cual quiere decir que estas deben ser descartadas debido a que no trabajarán en conjunto, a causa de que las cepas antagónicas inhiben el crecimiento de las demás.

#### 4.6. Pruebas de identificación

Por medio de la identificación de las cepas con las pruebas de identificación bioquímica se determinó que existen las siguientes cepas:

**Cuadro N° 14: Tipos de bacterias**

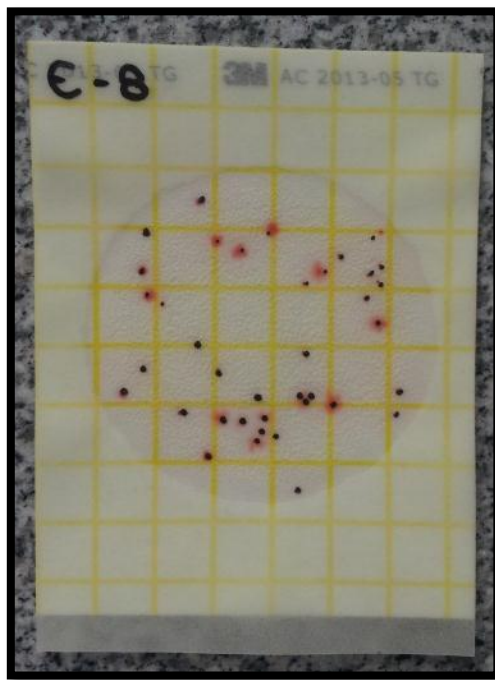
NOMBRE DE LA CEPA	CÓDIGO SOFTWARE	NOMBRE CIENTÍFICO	PORCENTAJE DE PROBABILIDAD
L3	00044020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	98.46%
L4	00200000	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	93.5%
L5	00240000	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	93.5%
L7	00654020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	79.51%
L9	24340220	<i>E. coli – inactiva</i>	87.94%
L10	00044020	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	98.46%
L12	60200024	<i>E. coli – inactiva</i>	96.48%

**FUENTE:** CAZORLA, E. 2014

Los resultados obtenidos nos demuestran que las pruebas de identificación nos dan un porcentaje alto de probabilidad, de las cuales el porcentaje obtenido en las cepas L3, L10 es de 98.46%, para las cepas L4, L5 es 93.5% y para la cepa L12 es de 79.51% dando como resultado que el microorganismo obtenido es *Xenorhabdus nematophilys* y finalmente las cepas L9 con un 87.94% y la cepa

L12 con un 96.48% resultando que el microorganismo obtenido es *E. coli* - *inactiva* siendo así resultados favorables, aunque todas las cepas en su forma macroscópica presentan características distintas en cuanto a su forma, bordes y color.

#### 4.7. Conteo de aerobios mesófilos



Fotografía N° 11: Conteo de aerobios mesófilos

Cuadro N° 15: Conteo aerobios mesófilos

Dilución	UFC/mL
-6	Incontable
-7	Incontable
-8	$38 \times 10^8$

FUENTE: CAZORLA, E. 2013

Se llevó a cabo la masificación del consorcio bacteriano y mediante un conteo de aerobios mesófilos se obtuvo como resultado que las diluciones realizadas a la  $-6$  y  $-7$  son incontables las UFC/mL y en la dilución a la  $-8$  hay un total de  $38 \cdot 10^8$  UFC/mL lo cual quiere decir que es muy buena la concentración de microorganismos.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

1. En el levantamiento de la Línea Base de la Laguna San Antonio del Cantón Riobamba se determinó que en la laguna existe contaminación de tipo biológica por un alto crecimiento de algas, y algunas especies de aves y anfibios se ven afectados por los asentamientos humanos que existen en los alrededores de la misma.
2. De la caracterización físico-química y microbiológica del sedimento de la Laguna San Antonio se determinó que algunos de los metales pesados encontrados en el sedimento se encuentran fuera del límite permisible de acuerdo a la normativa utilizada TULAS Anexo 6, tabla 2 como son: Boro (4.08ppm), Vanadio (48.43ppm), Bario (256.25ppm) y Cobre (36.33ppm), además mediante la caracterización microbiológica se estableció que existen en su mayoría bacilos grandes y bacilos pequeños los cuales pertenecen al género *Bacillus*.
3. De las 17 cepas obtenidas inicialmente, las cepas L3, L4, L5, L7, L9, L10 y L12 son las que formaron parte del consorcio bacteriano nativo, puesto que, mediante las pruebas a las que fueron sometidas estas son las que presentan características que las hacen más aptas para formar parte del mismo.
4. Se identificaron las diferentes bacterias nativas que se encuentran en el sedimento mediante el uso de pruebas GNA y GNB, de las cuales las cepas L3, L4, L5, L7 y L10 son el microorganismo *Xenorhabdus nematophilys* y las cepas L9 y L12 son *E. coli - inactive*
5. La masificación del consorcio bacteriano, generó resultados positivos debido a que se obtuvo una concentración de  $38 \times 10^8$  UFC/mL.



## **5.2. Recomendaciones**

- Al momento de llevar a cabo el escalamiento debe tomarse en cuenta la temperatura, ya que es necesaria para un desarrollo óptimo de los microorganismos.
- Realizar estudios a nivel piloto para saber la factibilidad que tendrá el consorcio al momento de utilizarlo a nivel de campo.
- Ampliar la investigación de la aplicación de consorcios bacterianos nativos en sedimentos contaminados.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ASOCIACIÓN MEXICANA DE MICROBIOLOGÍA.** Sistemas Bacterianos de Expulsión de Metales Tóxicos. (Revista Latinoamericana de Microbiología) (México) N° 1, Volumen 40. pp. 54, Enero - Junio – 1998
- **BACTERIAS (2013 - 07 - 25)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>  
(2013 - 10 - 20)
- **BURROWS, William. y otros.** Tratado de Microbiología. 21ª ed. México D. F. – México. Interamericana 1969, pp. 24-31
- **CANTÓN RIOBAMBA CULTURA (2013 - 04 - 06)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Riobamba#Cultura>.  
(2013 - 09 - 25)
- **CANTÓN RIOBAMBA PERFIL GEOGRÁFICO Y PRODUCTIVO (2013 - 06 - 25)**  
[http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento\\_institucional/savia/PDF/Cant%C3%B3n%20de%20Riobamba.pdf](http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/savia/PDF/Cant%C3%B3n%20de%20Riobamba.pdf). 20130625  
(2013 - 11 - 24)
- **CASTILLO, Francisco. y otros.** Biotecnología Ambiental, Madrid - España. Tebar. 2005. pp. 366-367  
[books.google.es/books?isbn=8473602110](http://books.google.es/books?isbn=8473602110)  
(2013 - 11 - 17)
- **CLIMA DE RIOBAMBA (10 - 04 - 2013)**  
<http://www.yoriobamba.com/index.php/datos/96-el-clima-y-los-recursos-chimborazo>  
(2014 - 02 - 02)

- **CHILE. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** Contaminación del Agua por la Agricultura y Actividades Afines. Santiago – Chile. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 1992, pp. 65  
[books.google.es/books?isbn=9253033800](http://books.google.es/books?isbn=9253033800)  
(2013 - 10 - 12)
  
- **CONTAMINACIÓN (29 - 09 - 2011)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Contaminaci%C3%B3n>  
(2014 - 02 - 15)
  
- **ECUADOR. GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO.** Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Chimborazo. 2011, pp. 42-45, 65
  
- **ECUADOR. MINISTERIO DEL AMBIENTE REPÚBLICA DEL ECUADOR.** Texto Unificado de Legislación Secundaria. Quito - Ecuador. Ministerio del Ambiente República del Ecuador. 2007. pp. 293-298, 362  
[books.google.es/books?isbn=9978672664](http://books.google.es/books?isbn=9978672664)  
(2013 - 10 - 01)
  
- **INFORMACIÓN SOCIO ECONÓMICA DE RIOBAMBA (2013 - 07 - 01)**  
<http://www.accionrural.com/index.php/oficinas/riobamba.20130701>  
(2013 - 09 - 01)
  
- **INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS. DATOS ESTADÍSTICOS DE HOMBRES Y MUJERES HABITANTES DEL CANTÓN RIOBAMBA**  
[http://www.inec.gob.ec/cpv/index.php?option=com\\_content&view=article&id=232&Itemid=128&lang=es.20130701](http://www.inec.gob.ec/cpv/index.php?option=com_content&view=article&id=232&Itemid=128&lang=es.20130701)  
(2013 - 07 - 01)

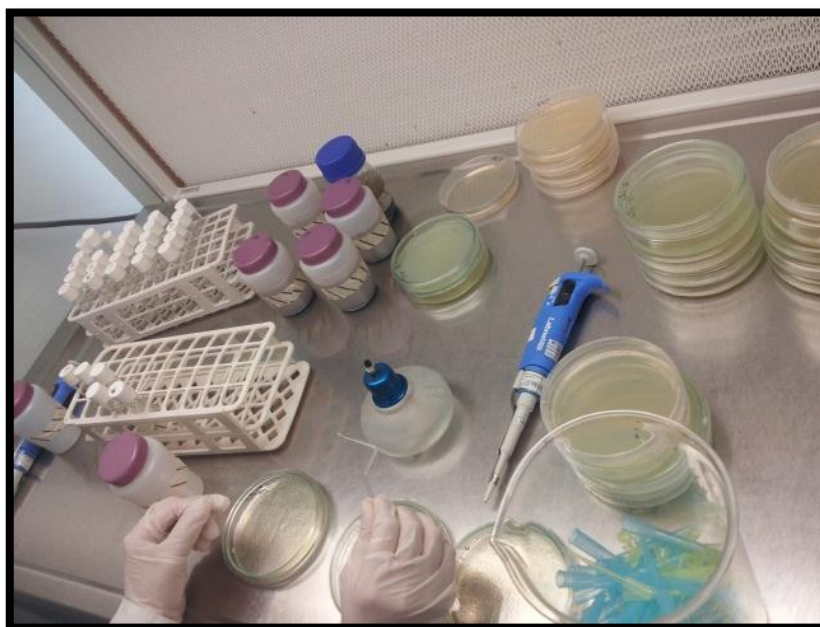
- **MARÍN, Rafael.** Físico Química y Microbiología de los Medios Acuáticos, Tratamiento y Control de Calidad de Aguas. Madrid - España. Díaz de Santos 2003, pp. 76  
[books.google.es/books?isbn=847978590X](http://books.google.es/books?isbn=847978590X)  
(2013 - 11 - 17)
  
- **METALES PESADOS (2012 - 05 - 21)**  
<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/140ikipedi/MetalesPes.htm>  
(2013 - 02 - 02)
  
- **MONZON, Anadón. y otros.** Sedimentación Fluvial, Sedimentación Lacustre, Sedimentación en Costas Siliclásticas, Deltas y Mares Someros. Madrid - España. Instituto Geológico y Minero de España 1984, pp. 93-96  
[books.google.es/books?isbn=8474742374](http://books.google.es/books?isbn=8474742374)  
(2013 - 11 - 17)
  
- **PRESCOTT, Harley. y otros.** Microbiología. 5ta ed. Madrid - España. McGraw Hill 2004, pp. 109-112
  
- **RIOBAMBA INFORMACIÓN GENERAL (2012 - 04 - 06)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Riobamba>  
(2013 - 11 - 20)
  
- **SEDIMENTOS (2012 - 06 - 04)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Sedimento>  
(2013 - 11 - 20)
  
- **SISTEMA INTEGRADO DE INDICADORES SOCIALES DEL ECUADOR**  
<http://www.siise.gob.ec/siiseweb/> 20130635  
(2013 - 07 - 24)

- **TIPOS DE BACTERIAS (2011 - 05 - 30)**  
<http://bkmmed.blogspot.com/>  
 (2013 - 01 - 24)
  
- **VANADIO (2001 - 03 - 12)**  
<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/v.htm>  
 (2013 - 02 - 25)
  
- **VENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN (2011 - 05 - 30)**  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Biorremediaci%C3%B3n>  
 (2013 - 01 - 24)
  
- **VOLKE, Tania. y otros.** Suelos Contaminados por Metales y Metaloides: Muestreo y Alternativas para su Remediación. México D. F. - México. 2005. pp. 94-96  
<books.google.es/books?isbn=9688174920>  
 (2013 - 11 - 17)

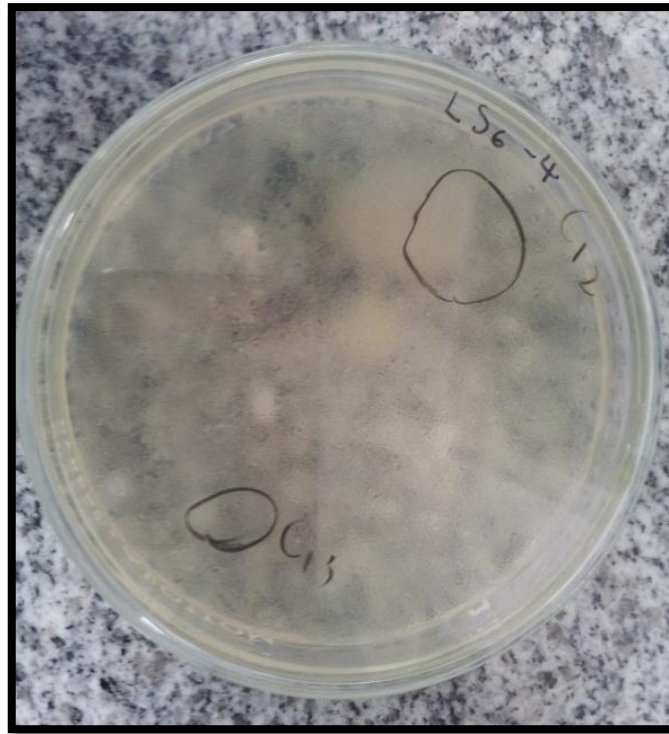
## ANEXOS



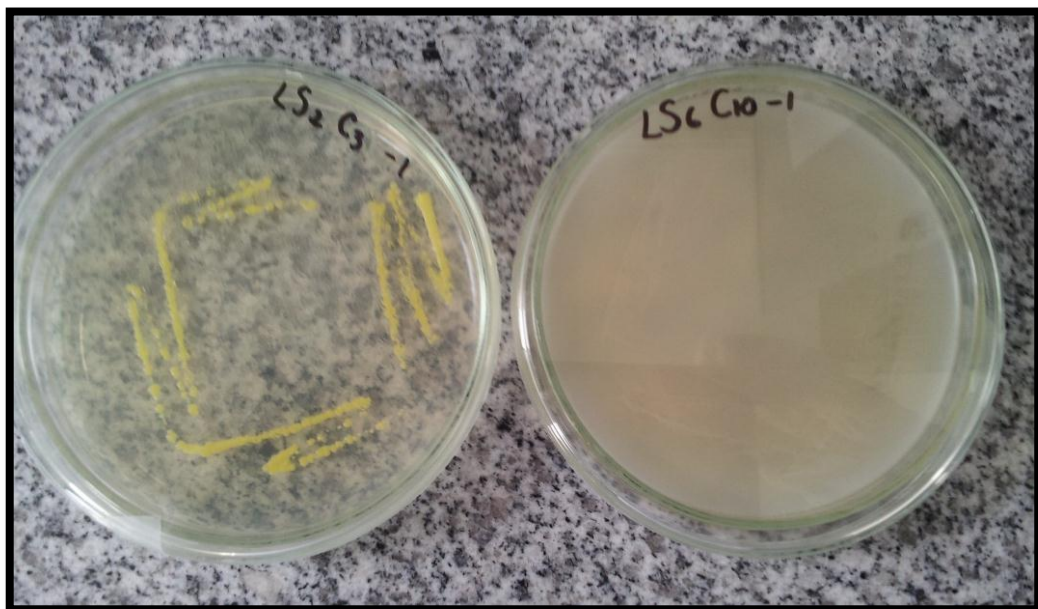
Fotografía A: Toma de muestras de sedimento de la laguna



Fotografía B: Siembra del inóculo

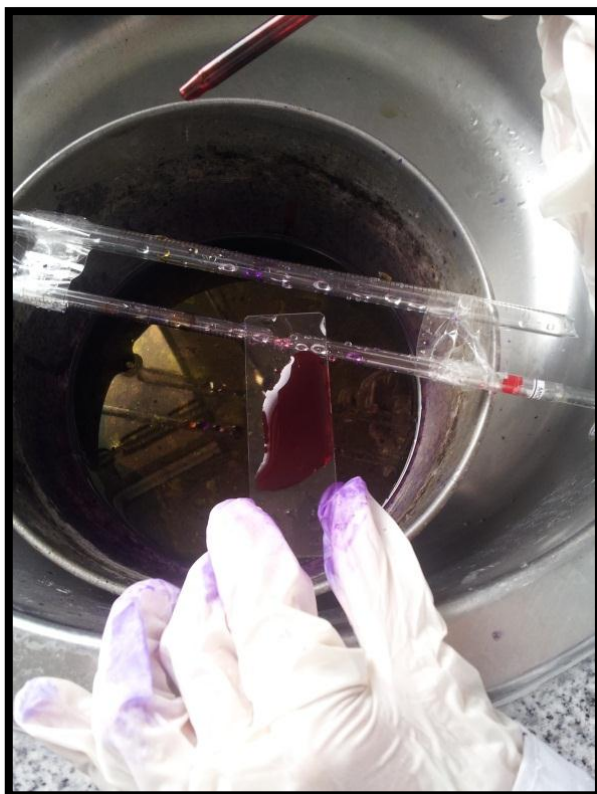


Fotografía C: Aislamiento de cepas



Fotografía D: Cepas puras



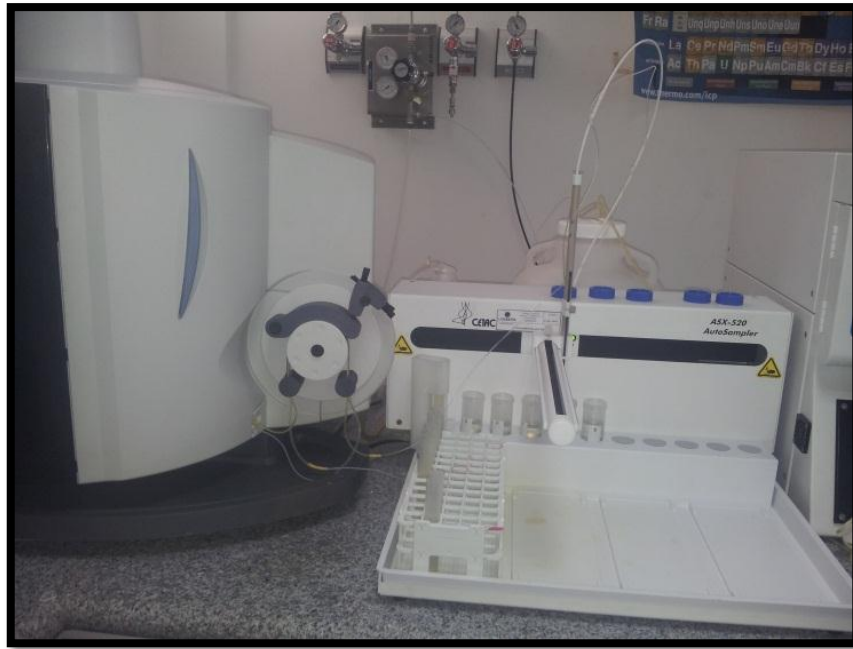


Fotografía E: Tinción Gram



Fotografía F: Elaboración de los bancos bacterianos

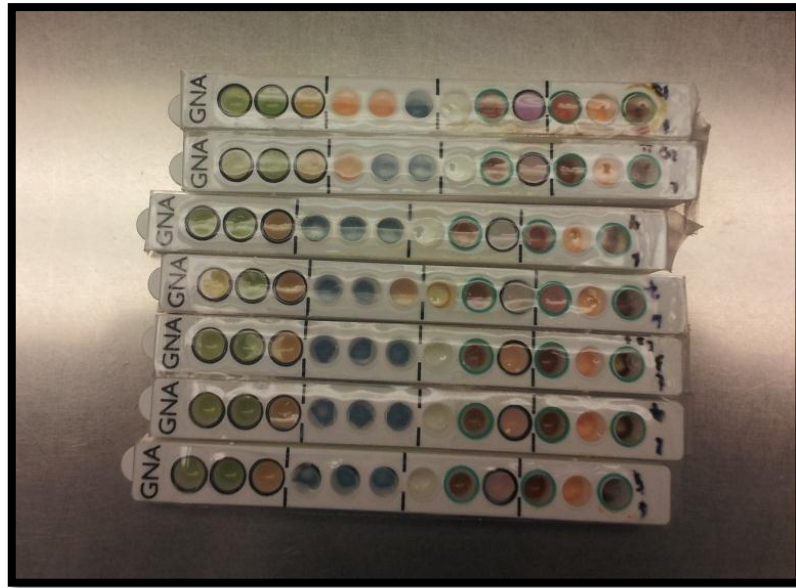




Fotografía G: ICP en funcionamiento



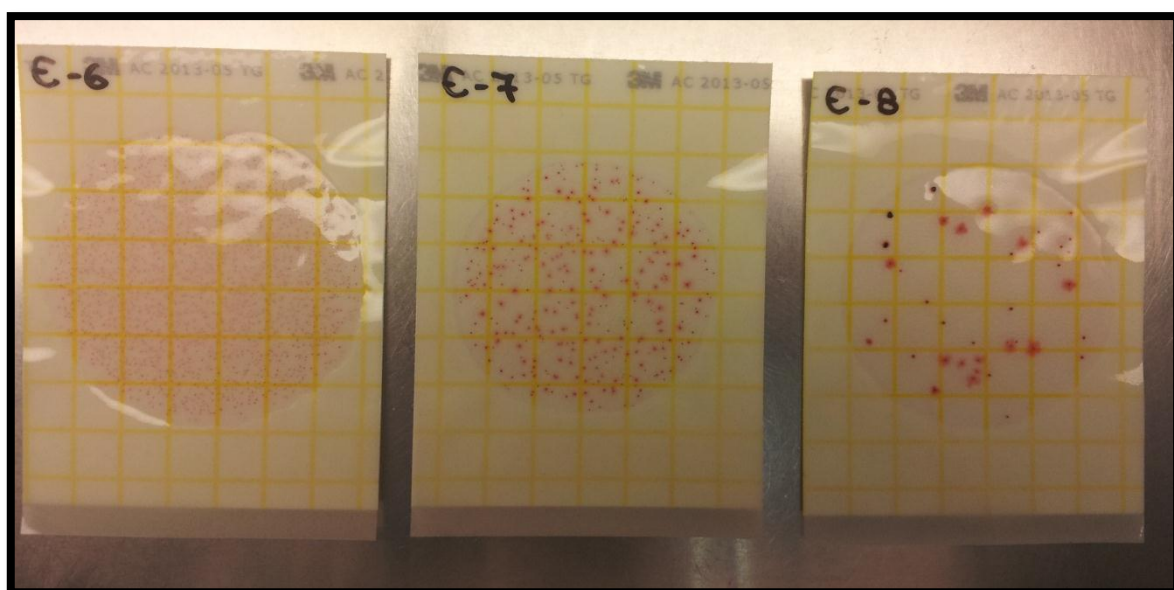
Fotografía H: Prueba de antagonismo



Fotografía I: Identificación de las cepas con las pruebas bioquímicas



Fotografía J: Masificación del consorcio bacteriano



Fotografía K: Conteo microbiológico